

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 738 575**

②① N° d'enregistrement national : **95 10541**

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : C 12 N 5/10, 15/85, 7/01//A 61 K 48/00

①②

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②② Date de dépôt : 08.09.95.

③⑦ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 14.03.97 Bulletin 97/11.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS ETABLISSE-  
MENT PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH -- FR et  
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY -- FR.

⑦② Inventeur(s) : DEDIEU JEAN FRANCOIS, ORSINI  
CECILE, PERRICAUDET MICHEL, VIGNE  
EMMANUELLE, YEH PATRICE, LATTA MARTINE et  
PROST EDOUARD.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : RHONE POULENC RORER SA.

⑤④ CELLULES POUR LA PRODUCTION D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS.

⑤⑦ L'invention concerne des cellules utilisables pour la  
production d'adénovirus défectifs comprenant, insérée  
dans leur génome, une partie de la région E4 d'un génome  
d'adénovirus portant la phase de lecture ORF6 sous  
contrôle d'un promoteur fonctionnel.

FR 2 738 575 - A1



La présente invention concerne de nouvelles lignées cellulaires utilisables pour la production d'adénovirus recombinants défectifs. Elle concerne également les préparations virales purifiées produites dans ces lignées, ainsi que les plasmides permettant leur construction. Plus particulièrement, les nouvelles lignées cellulaires  
5 selon l'invention permettent la transcomplémentation de la région E4 et une production clonale avec des titres élevés d'adénovirus recombinants défectifs notamment pour tout ou partie de la région E4.

Les adénovirus présentent certaines propriétés particulièrement avantageuses  
10 pour une utilisation comme vecteur de transfert de gènes en thérapie génique. Notamment, ils ont un spectre d'hôte assez large, sont capables d'infecter des cellules quiescentes, ne s'intègrent pas au génome de la cellule infectée, et n'ont pas été associés à ce jour à des pathologies importantes chez l'homme. Les adénovirus ont ainsi été utilisés pour transférer des gènes d'intérêt dans le muscle (Ragot et al., Nature  
15 361 (1993) 647), le foie (Jaffé et al., Nature genetics 1 (1992) 372), le système nerveux (Akli et al., Nature genetics 3 (1993) 224), etc.

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes  
20 tardifs (Cf figure 1). Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 notamment sont nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Les génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genbank M73260). De même des  
25 parties, voire la totalité d'autres génomes adénoviraux (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées.

Pour leur utilisation en thérapie génique, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes ( $\beta$ -gal, OTC,  $\alpha$ -1AT, cytokines, etc). Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de  
30 manière à le rendre incapable de répllication dans la cellule infectée. Ainsi, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés de la région E1, essentielle à la répllication virale, au niveau de laquelle sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al.,

Gene 50 (1986) 161). Ces adénovirus sont produits dans une lignée de complémentation (lignée 293) dans laquelle une partie du génome de l'adénovirus a été intégrée. Plus précisément, la lignée 293 contient l'extrémité gauche (environ 11-12%) du génome de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5), comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation, la région E1, incluant E1a, E1b, et une partie de la région codant pour la protéine pIX. Cette lignée est capable de trans-complémenter des adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la région E1, et de produire des stocks viraux ayant des titres élevés. Cependant, les vecteurs déficients pour la région E1 (vecteurs E1<sup>-</sup>, dits de première génération) présentent certains inconvénients pour une utilisation thérapeutique. En particulier, ils pourraient ne pas être totalement défectifs pour la réplication in vivo, en raison notamment de l'existence de certaines fonctions cellulaires transcomplémentantes. Ainsi, une activité de transcomplémentation de E1 a été mise en évidence dans les cellules de carcinome embryonnaire F9 (Imperiale et al., 1984). Une activité de même type, régulée par l'interleukine-6, a également été mise en évidence (Spergel et al., 1992). D'autres inconvénients liés à ces vecteurs sont la présence de nombreux gènes viraux, susceptibles d'être exprimés in vivo après transfert de gènes, et d'induire une réponse immunitaire et/ou inflammatoire.

Pour palier à ces inconvénients, il a été proposé de créer d'autres délétions ou modifications dans le génome de l'adénovirus. Ainsi, une mutation ponctuelle thermosensible a été introduite dans le mutant ts125, permettant d'inactiver la protéine de liaison à l'ADN (DBP) de 72kDa (Van der Vliet et al., 1975). Ces vecteurs peuvent également être produits avec des titres élevés dans les cellules de la lignée 293 à la température permissive (32°C). Toutefois, ce type de vecteur présente aussi un certain nombre d'inconvénients tels qu'une surexpression in vivo de la région E4; la présence d'une mutation ponctuelle, donc sujette à réversion, un risque d'activité partielle à 37°C, etc.

Une autre approche pour remédier à ces problèmes réside dans la délétion d'une autre région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale. A cet égard, la demanderesse s'est intéressée plus particulièrement à la région E4. La région E4 est en effet impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des ARN nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la réplication de l'ADN viral. Des vecteurs adénoviraux dans lesquels les régions E1 et E4 sont délétées possèdent donc un bruit de fond de

transcription et une expression de gènes viraux très réduits (voir notamment la demande PCT/FR94/00851). Toutefois, la construction et l'exploitation industrielle et thérapeutique de tels vecteurs implique la mise à disposition d'un système efficace de transcomplémentation de ces deux fonctions pour la production des stocks viraux.

5           La présente invention apporte une solution à ce problème. La présente invention fournit en effet des lignées cellulaires permettant la transcomplémentation de la région E4 et une production clonale et avec des titres élevés d'adénovirus recombinants défectifs pour cette région. Les lignées selon l'invention sont  
10           avantageusement capables de transcomplémenter les deux fonctions E1 et E4, et permettent donc de produire des virus déficients pour ces deux fonctions. La présente invention fournit également des plasmides permettant la construction de ces lignées; un procédé de préparation d'adénovirus recombinants défectifs et des stocks viraux purifiés. Plus particulièrement, la demanderesse a maintenant montré que des lignées de production capables de transcomplémenter efficacement la région E4 sont obtenues  
15           par introduction d'une partie seulement de la région E4. Ainsi, des lignées ayant des propriétés particulièrement avantageuses sont obtenues lorsque seulement une unité fonctionnelle réduite de la région E4, correspondant à la phase de lecture ORF6 ou aux phases de lecture ORF6 et ORF6/7, sont présentes.

          Un premier objet de l'invention réside donc dans une cellule utilisable pour la  
20           production d'adénovirus recombinants défectifs comprenant, insérée dans son génome, une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus comportant la phase de lecture ORF6 sous contrôle d'un promoteur fonctionnel. Selon un mode préféré, les cellules de l'invention comprennent une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus comportant les phases de lecture ORF6 et ORF6/7 sous contrôle d'un promoteur  
25           fonctionnel.

          Comme indiqué ci-avant, les lignées cellulaires selon la présente invention présentent des propriétés particulièrement avantageuses : Elles permettent tout d'abord la transcomplémentation des fonctions E1 et E4. Mais, de manière particulièrement  
30           avantageuse, elles sont capables d'induire la formation de plages de virus déficients dans ces fonctions, ce qui est indispensable au clonage des virus recombinants, puis à leur amplification et à leur purification. A cet égard, la demanderesse a en effet montré que des lignées possédant l'ensemble de la région E4 ou des unités fonctionnelles plus grandes, incluant par exemple la phase de lecture ORF4, sont incapables de former des

plages de virus déficients pour la région E4. L'identification d'unités fonctionnelles spécifiques de la région E4 permet la réalisation d'un système très efficace de transcomplémentation et de production de virus défectifs pour les fonctions E1 et E4. D'autres avantages des lignées selon l'invention sont notamment leur aptitude pour  
5 l'amplification en milieu liquide de tels virus déficients pour les régions E1 et E4, les titres élevés de tels virus qu'elles produisent, et l'absence de production de particule virale répliquative contaminante.

La région E4 du génome adénoviral est constituée de 7 phases ouvertes de  
10 lecture, désignées ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF3/4, ORF6 et ORF6/7 (figures 2 et 3). Comme indiqué ci-avant, les cellules de l'invention sont caractérisées particulièrement par la présence d'une partie seulement de cette région, comprenant la phase de lecture ORF6 éventuellement associée à la phase de lecture ORF6/7. Il est particulièrement important que la partie de la région E4 présente dans les cellules de  
15 l'invention ne contiennent pas la phase de lecture ORF4 fonctionnelle. Avantagusement, la région E4 présente dans les cellules de l'invention ne contient pas les phases de lecture ORF1-ORF4 fonctionnelles. De manière particulièrement préférée, la région E4 présente dans les cellules de l'invention est déletée d'une partie au moins des phases de lecture ORF1-ORF4. Ces différentes parties de la région E4  
20 peuvent être obtenues par coupures enzymatiques ou modifiées selon les méthodes connues de l'homme du métier. Selon un mode de réalisation préféré, les lignées cellulaires de l'invention comprennent un fragment inséré contenant moins de 2 kb de la région E4 d'un génome d'adénovirus contenant la totalité des phases de lecture ORF6 et éventuellement ORF6/7. A titre d'exemples préférés, la phase de lecture  
25 ORF6 peut être isolée de la région E4 sous forme d'un fragment BglII-PvuII, correspondant aux nucléotides 34115-33126, et les phases de lecture ORF6-ORF6/7 peuvent être isolées de la région E4 sous forme d'un fragment BglII-BglII correspondant aux nucléotides 34115-32490 du génome de l'Ad5.

A cet égard, un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention est  
30 constitué par une cellule comprenant, inséré dans son génome, un fragment BglII-BglII correspondant aux nucléotides 34115-32490 du génome de l'Ad5. Ce fragment est présent notamment dans le plasmide pORF6Gen décrit dans les exemples, utilisé pour la construction de la lignée cellulaire clone#2. Un autre mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention est constitué par une cellule comprenant, inséré

dans son génome, un fragment BglII-PvuII correspondant aux nucléotides 34115-33126 du génome de l'Ad5.

La partie de la région E4 présente dans les cellules selon l'invention peut être issue d'adénovirus de différentes origines ou sérotypes. Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Plus particulièrement, la région E4 présente dans les cellules selon l'invention peut être issue d'un adénovirus d'origine humaine ou animale.

Concernant les adénovirus d'origine humaine, on peut citer préférentiellement ceux classés dans le groupe C. Plus préférentiellement encore, parmi les différents sérotypes d'adénovirus humain, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5). Parmi les différents adénovirus d'origine animale, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. D'autres adénovirus d'origine animale sont cités notamment dans la demande WO94/26914 incorporée à la présente par référence.

Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, la partie de la région E4 est issue d'un génome d'adénovirus humain du groupe C. De manière plus préférentielle, elle est issue du génome d'un adénovirus Ad2 ou Ad5.

Comme indiqué précédemment, la partie de la région E4 présente dans les cellules de l'invention est placée sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans lesdites cellules. Avantageusement, il s'agit d'un promoteur inductible, permettant de contrôler les niveaux et/ou les périodes d'expression de ces gènes. De manière particulièrement avantageuse, il s'agit du promoteur du LTR de MMTV (Pharmacia), qui est induit par la dexaméthasone ou d'un promoteur régulé par la tétracycline (demande US publiée n°08/076,327; WO94/04672). Il est entendu que d'autres promoteurs peuvent être utilisés, et notamment des variants du LTR de MMTV portant par exemple des régions hétérologues de régulation (régions "enhancer" notamment).

Les cellules selon l'invention peuvent être préparées à partir de différentes cellules pharmaceutiquement utilisables, c'est-à-dire cultivables dans des conditions industriellement acceptables et n'ayant pas de caractère pathogène reconnu. Il peut

s'agir de lignées cellulaires établies ou de cultures primaires. Il s'agit avantageusement de cellules d'origine humaine, infectables par un adénovirus. A cet égard, on peut citer les cellules KB, Hela, 293, Vero, gmDBP6, etc.

Les cellules de la lignée KB sont issues d'un carcinome épidermique humain. Elles sont accessibles à l'ATCC (ref. CCL17) ainsi que les conditions permettant leur culture. La lignée de cellules humaines Hela est issue d'un carcinome de l'épithélium humain. Elle est également accessible à l'ATCC (ref. CCL2) ainsi que les conditions permettant sa culture. Les cellules de la lignée 293 sont des cellules de rein embryonnaire humain (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Cette lignée contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome de l'adénovirus humain Ad5 (12 %). La lignée de cellules gm DBP6 (Brough et al., Virology 190 (1992) 624) est constituée de cellules Hela portant le gène E2 d'adénovirus sous le contrôle du LTR de MMTV.

Il peut s'agir également de cellules d'origine canine (BHK, MDCK, etc). A cet égard, les cellules de la lignée canines MDCK sont préférées. Les conditions de culture des cellules MDCK ont été décrites notamment par Macatney et al., Science 44 (1988) 9.

Les lignées cellulaires selon l'invention peuvent être construites de différentes manières. De façon générale, elles sont préparées par transformation d'une culture cellulaire avec un plasmide portant le fragment sélectionné de la région E4 sous contrôle d'un promoteur fonctionnel. La transfection des cellules peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment en présence de phosphate de calcium, par électroporation, etc. Selon un mode particulier de réalisation, le plasmide utilisé porte également un gène marqueur permettant d'identifier et de sélectionner les cellules transformées. Il peut s'agir notamment de tout gène de résistance à un antibiotique (généticine, hygromycine, etc). Le gène marqueur peut également être porté par une construction séparée, co-transfectée avec le plasmide. Après transfection et sélection pour le gène marqueur, les cellules obtenues peuvent être sélectionnées pour leur capacité à transcomplémenter des adénovirus dépourvus de la région E4. Pour cela, différents adénovirus mutants défectifs pour différentes parties de la région E4 peuvent être utilisés, tels que notamment les adénovirus Ad2dl808 (Weinberg et al., 1986), Ad5dl1004, dl1007 ou dl1014 (Bridge et al., 1989), dl1011 (Bridge et al., 1993), comme indiqué dans les exemples.

Avantageusement, les cellules selon l'invention sont également capables de transcomplémenter pour la région E1. Celles-ci peuvent être construites comme décrit

ci-avant à partir de cellules qui transcomplémentent déjà la région E1 (exemple : cellules 293), ou par introduction séquentielle d'une construction apportant la région E1 et d'une construction apportant la partie de la région E4 selon l'invention.

5 Selon un mode particulièrement préféré, les cellules selon l'invention dérivent de la lignée cellulaire 293. A cet égard, des résultats particulièrement avantageux ont été obtenus avec des cellules de la lignée 293 transformées par le plasmide pORF6Gen.

10 La présente invention décrit également la construction de plasmides comprenant une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus portant la phase de lecture ORF6 ou ORF6 et ORF6/7 sous contrôle d'un promoteur inducible (voir notamment plasmide pORF6Gen). Ces plasmides peuvent être utilisés directement pour transfecter une population cellulaire choisie, puis, par sélection, pour l'identification de cellules ayant acquis stablement la fonction E4.

15 Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation des cellules décrites ci-avant pour la production d'adénovirus recombinants défectifs au moins pour la région E4. L'invention fournit en effet un procédé de production d'adénovirus recombinants défectifs au moins pour la région E4 particulièrement avantageux, mettant en oeuvre les cellules ci-avant. Selon ce procédé, on transforme une culture de cellules telles que décrites ci-avant avec un ou plusieurs plasmides apportant les différentes régions du  
20 génome dudit adénovirus recombinant défectif puis on récolte les virus produits. Ce procédé est particulièrement avantageux pour la production d'adénovirus possédant des régions E1 et E4 non fonctionnelles. Il s'agit notamment de vecteurs dans lesquels les régions E1 et E4 ont été inactivées ou rendues non fonctionnelles par délétion totale ou partielle. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyen des techniques du génie génétique, ou encore  
25 par traitement au moyen d'agents mutagènes. La ou lesdites modifications génétiques peuvent être localisées dans une partie codante de la région, ou en dehors d'une région codante, et par exemple dans les régions responsables de l'expression et/ou de la régulation transcriptionnelle desdits gènes. La délétion peut être effectuée par digestion  
30 au moyen d'enzymes de restriction appropriées, puis ligature, selon les techniques classiques de biologie moléculaire.



Selon un mode particulièrement avantageux, le procédé de l'invention est utilisé pour la production d'adénovirus recombinants dans lesquels la région E1 est inactivée par délétion d'un fragment PvuII-BglII allant du nucléotide 454 au nucléotide 3328, sur la séquence de l'adénovirus Ad5. Cette séquence est accessible dans la littérature et également sur base de données (voir notamment Genebank n° M73260). Dans un autre mode de réalisation préféré, la région E1 est inactivée par délétion d'un fragment HinfII-Sau3A allant du nucléotide 382 au nucléotide 3446. Dans un mode particulier, le procédé permet la production de vecteurs comprenant une délétion de la totalité de la région E4. Ceci peut être réalisé par excision d'un fragment MaeII-MscI correspondant aux nucléotides 35835-32720. Les lignées cellulaires selon l'invention sont en effet capables de transcomplémenter et d'amplifier des adénovirus portant tout type de délétion ou inactivation de la région E4. Dans un autre mode particulier, seule une partie fonctionnelle de E4 est déletée. Cette partie comprend au moins les phases ORF3 et ORF6. A titre d'exemple, ces phases codantes peuvent être déletées du génome sous forme de fragments PvuII-AluI et BglII-PvuII respectivement, correspondant aux nucléotides 34801-34329 et 34115-33126 respectivement. Les délétions de la région E4 du virus Ad2 dl808 ou des virus Ad5 dl1004, Ad5 dl1007, Ad5 dl1011 ou Ad5 dl1014 peuvent également être utilisées dans le cadre de l'invention. A cet égard, les cellules de l'invention sont particulièrement avantageuses pour la production de virus comprenant une région E1 inactive et une délétion dans la région E4 du type de celle présente dans le génome de Ad5 dl1014, c'est-à-dire de virus E4<sup>-</sup> conservant la phase de lecture ORF4.

La présente invention décrit donc également des adénovirus recombinants défectifs dont le génome comprend une délétion dans la région E1 et une délétion dans la région E4. Plus particulièrement, elle décrit des adénovirus recombinants défectifs dont le génome comprend une délétion dans la région E1 et une délétion dans la région E4 correspondant au moins aux phases de lectures ORF3 et ORF6. Ainsi, les adénovirus selon l'invention comportent préférentiellement les délétions suivantes affectant tout ou partie des régions E1 et E4 :

- Adénovirus  $\Delta E1, ORF3^-, ORF6^-$  : délétion de tout ou partie de la région E1 et des nucléotides 34801-34329 et 34115-33126 de la région E4;

- Adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF1^+$  : délétion de tout ou partie de la région E1 et de la région E4 à l'exception de la phase de lecture ORF1. Cette délétion dans la région E4 couvre préférentiellement les nucléotides 33093 à 35053. Elle est obtenue par exemple à partir du mutant Ad5 dl1004. D'autres délétions peuvent être utilisées pour la réalisation d'adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF1^+$  de l'invention, sur la base des informations données dans le présente demande et de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 4. Cette séquence double brin représente la partie droite du génome adénoviral, incluant la région E4 et l'ITR droite du nucléotide 32749 (1 sur SEQ ID n°4) à 35935 (3186 sur SEQ ID n°4). Il s'agit d'une séquence purement illustrative et d'autres séquences publiées sont également utilisables. Les différentes phases de lecture de la région E4 sont représentées, notamment ORF7, ORF6, ORF4, ORF3, ORF2 et ORF1. Un adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF1^+$  de l'invention comprend avantageusement une délétion dans la région E1 et une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF7 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF2. Encore plus préférentiellement, la délétion concerne un fragment dont l'extrémité 5' est comprise entre les nucléotides 32920 à 33190 du génome de l'adénovirus et dont l'extrémité 3' est comprise entre les nucléotides 34710 à 35090 du génome adénoviral. Cette délétion correspond environ aux nucléotides 170 à 440 (extrémité 5') et 1960 à 2340 (extrémité 3') sur la séquence SEQ ID n°4.

- Adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF4^+$  : délétion de tout ou partie de la région E1 et de la région E4 à l'exception de la phase de lecture ORF4. Un adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF4^+$  de l'invention comprend avantageusement une délétion dans la région E1, une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF7 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF6 (à l'exception de la partie chevauchant la phase de lecture ORF4), et une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF3 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF1 ou dans la région promotrice de E4. Plus préférentiellement, ces adénovirus selon l'invention comprennent :

- (i) une délétion de tout ou partie de E1,
- (ii) une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise entre les nucléotides 32920 à 33190 du génome de l'adénovirus et dont l'extrémité 3' est comprise entre les nucléotides 33200 à 34000 du génome adénoviral, et,
- (iii) une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise entre les nucléotides 34360 à 34700 du génome de l'adénovirus et dont l'extrémité 3' est comprise entre les nucléotides 35150 à 35530 du génome adénoviral.

Les positions correspondantes de la délétion (ii) sur la séquence SEQ ID n° 4 sont 180 à 445 (extrémité 5') et 450 à 1250 (extrémité 3'). Les positions correspondantes de la délétion (iii) sur la séquence SEQ ID n° 4 sont 1610 à 1950 (extrémité 5') et 2410 à 2870 (extrémité 3').

5 Ces délétions dans la région E4 couvrent préférentiellement les nucléotides 33093(SmaI)-33695 et 34634-35355(SmaI). Elles peuvent être obtenues par exemple à partir du mutant Ad5 dl1014.

10 - Adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4$  : délétion de tout ou partie de la région E1 et des nucléotides 32720-35835, ou 33466-35355 (cette délétion peut être obtenue par exemple à partir du mutant Ad5 dl1007) ou 33093-35355 (cette délétion peut être obtenue par exemple à partir du mutant Ad5 dl1011). Ces 3 délétions couvrent la totalité de la région E4.

15 Comme indiqué ci-avant, la délétion dans la région E1 couvre avantageusement tout ou partie des régions E1A et E1B. Cette délétion doit être suffisante pour rendre le virus incapable de répllication autonome dans une cellule. La partie de la région E1 délétée dans les adénovirus selon l'invention couvre avantageusement les nucléotides 454-3328 ou 382-3446.

20 Les positions données ci-dessus font référence à la séquence de l'adénovirus Ad5 sauvage telle que publiée et accessible sur base de donnée. Bien que des variations mineures puissent exister entre les différents sérotypes d'adénovirus, ces positions sont généralement applicables à la construction d'adénovirus recombinants selon l'invention à partir de tout sérotype, et notamment des adénovirus Ad2 et Ad7.

25 Par ailleurs, les adénovirus de l'invention peuvent posséder d'autres altérations au niveau de leur génome. En particulier, d'autres région peuvent être délétées pour augmenter la capacité du virus et réduire ces effets secondaires liés à l'expression de gènes viraux. Ainsi, tout ou partie de la région E3 ou IVa2 notamment peut être délétée. Concernant la région E3, il peut cependant être particulièrement avantageux de conserver la partie codant pour la protéine gp19K. Cette protéine permet en effet  
30 d'éviter que le vecteur adénovirus fasse l'objet d'une réaction immunitaire qui (i) limiterait son action et (ii) pourrait avoir des effets secondaires indésirables. Selon un mode particulier, la région E3 est délétée et la séquence codant pour la protéine gp19k est réintroduite sous contrôle d'un promoteur hétérologue.

Les adénovirus recombinants selon l'invention possèdent des propriétés particulièrement attractives pour une utilisation en thérapie génique. Ces vecteurs combinent en effet des propriétés d'infection, de sécurité (les risques de réaction immunitaire et/ou inflammatoire sont fortement réduits) et de capacité de transfert de gènes très élevées. De plus, les lignées de l'invention permettent la production de stocks viraux totalement dépourvus de particules répliquatives contaminantes (RCA). Ainsi, les résultats présentés montrent la construction et la production par les lignées de l'invention d'adénovirus défectifs pour les régions E1 et E4, dépourvus de RCA. En particulier, l'apparition de particules contaminantes répliquatives E4+ lors de la production des virus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF1^+$ ,  $\Delta E1, \Delta E4, ORF4^+$  ou  $\Delta E1, \Delta E4$  selon l'invention n'est pas possible avec les lignées de l'invention puisque (i) ces virus ne contiennent pas de séquences recouvrantes de part et d'autres de la région intégrée dans le génome de la cellule (Figure 3) et (ii) un événement de recombinaison homologue simple entre les régions cellulaires et virales générerait un virus non viable dépourvu d'ITR droite. Un autre avantage des virus selon l'invention réside dans leur capacité de clonage accrue, permettant l'insertion de transgènes de grande taille (supérieure à 10kb). Ceci permet en particulier l'utilisation de séquences régulatrices de la transcription permettant d'améliorer l'efficacité, la régulation et la durée d'expression. Ceci permet en outre d'utiliser des doses plus faibles de virus et d'obtenir un effet thérapeutique comparable avec des effets secondaires cytopathiques très réduits.

Comme indiqué avant, les adénovirus constituent des vecteurs de transfert de gènes très efficaces pour des applications de thérapie génique et cellulaire. Pour cela, une séquence d'acides nucléiques hétérologue dont le transfert et/ou l'expression dans une cellule, un organe ou un organisme est recherché peut être insérée dans leur génome. Cette séquence peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques, tels qu'un gène dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique. Parmi les produits thérapeutiques, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; les apolipoprotéines : ApoA1, ApoAIV, ApoE, etc (WO94/25073), la dystrophine ou une minidystrophine (WO93/06223), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (WO94/24297), les gènes codant pour des facteurs impliqués

dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc, les gènes suicides : Thymidine kinase, cytosine désaminase, etc; ou encore tout ou partie d'une immunoglobuline naturelle ou artificielle (Fab, ScFv, etc, WO94/29446), etc. Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de

5 contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Le gène thérapeutique peut aussi

10 être un gène codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme une réponse immunitaire, en vue de la réalisation de vaccins. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'epstein barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Généralement, la séquence d'acides nucléiques hétérologue comprend

15 également une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans la cellule infectée, ainsi qu'une région située en 3' du gène d'intérêt, et qui spécifie un signal de fin transcriptionnelle et un site de polyadénylation. L'ensemble de ces éléments constitue la cassette d'expression. Concernant la région promotrice, il peut s'agir d'une

20 région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux ou de toute séquence promotrice ou dérivée, stimulant ou

25 réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non et de façon inductible ou non. A titre d'exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter, ou du génome d'un virus, et notamment, les promoteurs des gènes E1A, MLP d'adénovirus, le promoteur CMV, LTR-RSV, etc. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut citer également les promoteurs ubiquitaires (HPRT, vimentine,  $\alpha$ -actine, tubuline, etc), les promoteurs des filaments intermédiaires

30 (desmine, neurofilaments, kératine, GFAP, etc) les promoteurs de gènes thérapeutiques (type MDR, CFTR, facteur VIII, etc) les promoteurs spécifiques de tissus (pyruvate kinase, villine, promoteur de la protéine intestinale de liaison des acides-gras, promoteur de l'actine  $\alpha$  des cellules du muscle lisse, promoteurs

35 spécifiques pour le foie : Apo AI, Apo AII, Albumine humaine etc) ou encore les promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de

l'acide rétinolique, etc.). En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire. Par ailleurs, lorsque l'acide nucléique inséré ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus  
5 défectif en aval d'une telle séquence.

Par ailleurs, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule  
10 cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

La cassette d'expression du gène thérapeutique peut être insérée en différents  
15 sites du génome de l'adénovirus recombinant, selon les techniques décrites dans l'art antérieur. Elle peut tout d'abord être insérée au niveau de la délétion E1. Elle peut également être insérée au niveau de la région E3, en addition ou en substitution de séquences. Elle peut également être localisée au niveau de la région E4 déletée.

20 Les cellules selon l'invention peuvent également être utilisés pour la production de virus adéno-associés (AAV) recombinants. Ceci constitue une autre application particulièrement avantageuse des cellules de l'invention. Ces cellules permettent en effet d'obtenir des titres élevés d'AAVr, totalement dépourvus de virus replicatifs contaminants. A cet effet, la présente invention concerne également  
25 l'utilisation d'une cellule comprenant, insérée dans son génome, tout ou une partie de la région E4 du génome d'un adénovirus comportant au moins la phase de lecture ORF6 pour la production d'AAV recombinants. Les cellules sont avantageusement telles que définies ci-avant.

L'AAV est un virus à ADN de la famille des parvovirus humains, de taille  
30 relativement réduite, qui s'intègre dans le génome des cellules qu'il infecte, de manière stable et site-spécifique. Les AAV sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et  
35 caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une

région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite  
5 du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus. L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Dans les AAV recombinants, les gènes rep et cap sont généralement délétés et remplacés par un gène d'intérêt.

10 L'une des difficultés limitant l'utilisation des AAV comme vecteur de thérapie génique provient du fait que l'AAV ne se réplique efficacement que dans les cellules co-infectées par un virus helper comme par exemple l'adénovirus ou le virus de l'herpès. La préparation d'AAV recombinants défectifs implique donc la présence de 3 composants qui doivent être cotransfectés et co-infectés dans la  
15 cellule de production : un virus auxiliaire (par exemple un adénovirus), un plasmide contenant une séquence nucléique d'intérêt bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV.

L'inconvénient majeur de ce système est qu'il utilise un virus helper. Celui-ci est généralement répliatif et présent en mélange avec les AAVr produits. Les  
20 stocks viraux sont donc potentiellement contaminés par un virus helper ce qui rend ces stocks incompatibles avec une utilisation thérapeutique. En outre, en raison du nombre élevé de composants impliqués dans ce procédé, les titres de virus obtenus sont assez faibles, de l'ordre de  $10^8$ .

25 La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. La présente invention fournit en effet un procédé efficace de production d'AAVr, permettant d'obtenir des stocks de virus à titres très élevés (supérieurs à  $10^{10}$ ), non contaminés par un virus répliatif.

Cinq gènes de l'adénovirus sont nécessaires à la réplication de l'AAV :  
30 E1A, E1B, E2A, VA et E4. Ces gènes doivent être présents et s'exprimer dans la cellule productrice pour une production optimale de particules infectieuses. Selon le procédé de l'invention, on utilise maintenant une lignée cellulaire de production contenant déjà dans son génome certains de ces gènes, et notamment tout ou partie de la région E4, préférentiellement combinée à la région E1. L'intérêt d'utiliser ce  
35 type de lignée cellulaire est que cela permet d'utiliser un adénovirus helper défectif,

c'est-à-dire non capable de générer de manière autonome des particules infectieuses. Ainsi, les stocks d'AAVr produits sont non contaminés.

En effet, les fonctions intégrées dans la lignée peuvent être déléguées du génome de l'adénovirus helper.

5 Ceci est particulièrement avantageux pour l'utilisation d'un adénovirus helper d'origine humaine. Ainsi, dans une lignée cellulaire telle que décrite ci-dessus capable de transcomplémenter les fonctions E1 et E4 de l'adénovirus, il est possible d'utiliser un adénovirus helper d'origine humaine (ad5 ou ad2 par exemple) déficient pour ces fonctions. Un tel adénovirus helper ne pouvait être utilisé efficacement  
10 dans les procédés de l'art antérieur car l'absence de régions essentielles à la production d'AAVr (E1 et E4) limitait considérablement l'efficacité du procédé. Or, un tel adénovirus est totalement incapable de générer de manière autonome des particules infectieuses. De ce fait, sa présence éventuelle dans un stock d'AAVr n'affecte pas la qualité pharmaceutique de cette préparation.

15 Ceci permet également l'utilisation plus efficace d'un adénovirus helper d'origine animale, de préférence canine.

En plus des considérations de qualité du stock viral produit, de manière tout à fait avantageuse, le procédé selon l'invention permet d'obtenir des titres de virus  
20 particulièrement élevés. Ceci est une autre propriété tout à fait remarquable du procédé selon l'invention. Ainsi, les titres produits, pouvant dépasser  $10^{11}$  génomes viraux par ml, sont jusqu'à 1000 fois supérieurs aux titres observés dans l'art antérieur. Ces résultats sont tout à fait inattendus et d'une importance capitale en terme d'exploitation industrielle. Les résultats sont particulièrement remarquables  
25 avec les lignées cellulaires dérivées de la lignée 293 et qui expriment ORF6, éventuellement associée à ORF6/7, ou la totalité de E4, sous le contrôle du promoteur MMTV (elles contiennent donc E1 exprimé constitutivement et E4 ou une partie de E4 comprenant au moins ORF6 exprimé conditionnellement en présence de dexaméthasone).

30 Même en l'absence de tout virus helper, ces lignées cellulaires sont capables de répliquer des virus AAV. Ainsi, quand on infecte ces lignées avec un AAV sauvage ou quand on transfecte ces lignées par un plasmide infectieux pAV2 (Mac Laughlin, Gene, 23, 67-73, 1983), on peut faire répliquer l'ADN de l'AAV. L'efficacité de la répllication reste certes inférieure à celle obtenue en présence d'un



adénovirus helper, mais demontre les proprietes particulierement remarquables des cellules selon l'invention.

Une lignee cellulaire particulierement avantageuse pour la mise en oeuvre du procede selon l'invention est representee par une cellule de la lignee 293 comprenant,  
5 insérée dans son génome, un fragment BglII-BglII correspondant aux nucléotides 34115-32490 du génome de l'Ad5. Il s'agit par exemple d'une cellule de la lignée 293 transformée par le plasmide pORF6Gen (Cf exemples).

En coinfectant une cellule de ce type avec un adénovirus helper (par  
10 exemple humain au phénotype sauvage, ou délété pour E1, ou un double délétant pour E1 et E4, ou de l'adénovirus canin), et en cotransfectant deux plasmides: un plasmide-AAV, portant les ITRs de l'AAV encadrant un acide nucleique d'interet, et un plasmide portant les fonctions rep et cap, on peut produire en présence de dexaméthasone des particules de virus AAV infectieuses à des titres élevés. Comme  
15 indique dans les exemples, des titres en génomes de  $10^{11}$  génomes /ml peuvent etre obtenus lorsque l'on opere sur des quantites faibles de cellules. En operant sur des quantités de cellules plus importantes, des titres plus eleves peuvent etre obtenus, jusqu'à  $10^{12}$ . De plus en utilisant de l'adénovirus canin comme virus helper, le  
procédé de l'invention permet d'avoir des stocks d'AAV à des titres élevés sans  
20 contamination par de l'Ad humain.

Ainsi, un autre objet de l'invention reside dans un procédé de production d'AAV recombinants caractérisé en ce que l'on introduit dans une culture de cellules  
25 comprenant, inserees dans leur genome, une partie de la region E4 du genome d'un adénovirus comportant au moins la phase de lecture ORF6 :

- un plasmide AAV portant un acide nucleique d'interet borde d'ITRs d'AAV,
  - un adénovirus helper, et,
  - les fonctions Rep et Cap de l'AAV.
- 30 puis on récolte les virus produits.

Selon un mode de realisation particulier, la cellule productrice est une cellule comportant l'intégralite de la region E4. Selon un autre mode de realisation  
particulierement avantageux, la cellule productrice est une cellule comportant une  
35 partie de la region E4 comportant au moins la phase de lecture ORF6 et

eventuellement la phase de lecture ORF6/7. Il s'agit de maniere particulièrement preferee d'une cellule telle que definie precedemment pour la production d'adénovirus. En particulier, il s'agit avantageusement d'une cellule capable de transcomplementer les fonctions E1 et E4 de l'adénovirus. Un exemple prefere est represente par une  
5 cellule de la lignee 293 contenant insere dans son genome, toute la region E4 ou une partie de la region E4 comportant au moins la phase de lecture ORF6 et eventuellement la phase de lecture ORF6/7. A titre d'exemple on peut citer les cellules Clone#2 (IGRP2) et Clone#4 (IGRP4).

Comme indique precedemment, l'adénovirus helper peut etre un adénovirus  
10 humain au phenotype sauvage, ou defectif pour la region E1, ou un double delétant pour E1 et E4, ou encore de l'adénovirus canin. L'avantage du procede selon l'invention reside d'une part dans les titres tres eleves en AAVr, et egalement dans le caractere securitaire des stocks qu'il permet de produire. Ainsi, il est particulièrement  
15 avantageux d'utiliser un adénovirus helper defectif, c'est-a-dire incapable de generer de maniere autonome des particules infectieuses. L'adénovirus helper selon le procede de l'invention est avantageusement un adénovirus humain possedant une deletion dans la region E4. Plus preferentiellement encore, il s'agit d'un adénovirus humain defectif pour les regions E1 et E4. Selon un autre mode de realisation avantageux, il s'agit  
20 d'un adénovirus canin, de preference choisi parmi les souches CAV2.

Dans le procede selon l'invention, les fonctions rep et cap de l'AAV sont  
preferentiellement apportees par co-transfection des cellules avec un plasmide portant les regions rep et cap de l'AAV. Ces regions peuvent etre sous controle du promoteur P5 homologue ou d'un promoteur constitutif comme LTR-RSV. Ces  
25 fonctions peuvent egalement etre apportees directement par le virus helper utilise. Il est en effet possible d'insérer dans l'adénovirus helper une cassette contenant les regions rep et cap de l'AAV.

Dans le procede de l'invention, la transfection du ou des plasmides  
30 (plasmide-AAV et plasmide-RepCap le cas echeant) peut etre realisee par toute technique connue de l'homme du metier. Cependant, plus le taux de transfection est bon, plus les niveaux de production peuvent etre ameliores. A cet egard, la demanderesse a maintenant mis au point une methode particulièrement efficace pour la transfection des plasmides dans les cellules de production. Cette methode  
35 repose sur l'utilisation d'un lipide polycationique et d'un agent compactant les

acides nucleiques. L'un des avantages de cette methode reside en outre dans le fait qu'elle ne semble pas alterer la morphologie ou l'etat physiologique des cellules. Différents types de lipides cationiques peuvent etre utilises, tels que la lipofectamine, le Transfectam, etc. Parmi les agents compactant l'ADN, on peut  
5 citer de maniere avantageuse des peptides derives de proteines nucleaires telles que les histones, la nucleoline, etc.

Les differents plasmides et virus helper peuvent etre introduits dans la cellule productive de maniere concomitante ou separee. Dans le cas d'une introduction  
10 separee, l'ordre dans lequel les differents composants sont inseres ne semble pas etre essentiel pour obtenir des titres eleves. Comme illustre dans les exemples, des titres importants ont ete obtenus lorsque, dans un premier temps, les plasmides sont co-transfectés dans les cellules puis, dans un deuxième temps, les cellules sont infectees par le virus helper.

15 Un mode de realisation specifique de l'invention reside dans un procede de production d'AAV recombinants caracterise en ce que, dans une culture de cellules transcomplementant les fonctions E1 et E4 de l'adenovirus, on cotransfecte, en presence d'un lipide polycationique et d'un agent compactant, un plasmide AAV  
20 portant un acide nucleique d'interet borde d'ITRs d'AAV et un plasmide portant les regions rep et cap de l'AAV; on co-infecte ladite culture avec un adenovirus helper choisi parmi les adenovirus humains d'origine Ad2 ou Ad5 defectifs pour les regions E1 et E4 et les adenovirus canins d'origine CAV2, puis on recolte les virus produits.

Ce mode de realisation permet d'obtenir des titres de virus eleves et des  
25 stocks de qualite pharmaceutique.

La presente invention concerne également les préparations virales purifiées (adenovirus et AAV) obtenues selon le procede de l'invention, ainsi que toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adenovirus ou AAV recombinants defectifs prepares selon ce procede. Les compositions pharmaceutiques  
30 de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en

particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de

5 solutés injectables. D'autres excipients peuvent être utilisés tels que par exemple un hydrogel. Cet hydrogel peut être préparé à partir de tout polymère (homo ou hétéro) bio-compatible et non cytotoxique. De tels polymères ont par exemple été décrits dans la demande WO93/08845. Certains d'entre eux, comme notamment ceux obtenus à

10 partir d'oxyde d'éthylène et/ou de propylène sont commerciaux. Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière

générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu

15 et les AAV, entre  $10^6$  et  $10^{11}$ . Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

20 Selon le gène thérapeutique, les virus ainsi produits peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies, incluant les maladies génétiques (dystrophie, fibrose kystique, etc), les maladies neurodégénératives (alzheimer, parkinson, ALS, etc), les cancers, les pathologies liées aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéïnémies, les pathologies liées aux infections virales

25 (hépatites, SIDA, etc), etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### **Légende des figures**

30 **Figure 1** : Organisation génétique de l'adénovirus Ad5. La séquence complète de l'Ad5 est disponible sur base de données et permet à l'homme du métier de sélectionner ou de créer tout site de restriction, et ainsi d'isoler toute région du génome.

**Figure 2** : Organisation génétique de la région E4.

**Figure 3 :** Organisation génétique de la région E4 dans les adénovirus sauvage et E4 défectifs. La taille de la délétion est représentée par une barre épaisse.

**Figure 4 :** (A) Représentation schématique de la cassette MMTV LTR/(ORF6 + ORF7). Les oligos 1, 2 et 3 utilisés pour l'amplification ou la RT-PCR sont localisés. + 1 = Site d'initiation de la transcription. AAA = Site de polyadénylation. (B) Structure des produits obtenus par RT-PCR. SD = Site 5' donneur d'épissage. SA = Site 3' accepteur d'épissage.

**Figure 5 :** Analyse de la production de la fibre adénovirale par détection immunologique à l'aide d'un sérum polyclonal contre la fibre (Boulanger et al.). Les extraits cellulaires sont préparés après 72h d'infection virale, la dexaméthazone est ajoutée en même temps que le virus (concentration finale 600 nM). (A) Infection par le virus dl1014 (MOI = 10); (B) Infection par le virus dl1001 (MOI = 1); Infection par le virus dl1004 (MOI = 10); (wt) Infection par le virus Ad5 (MOI = 10).

**Figure 6 :** Inductibilité de E4 dans les cellules du clone #2. Analyse des extraits cellulaires non infectés (contrôle inférieur à 0) ou infectés par le virus dl1007, 72 après infection. DM = dexaméthazone (600 nM).

**Figure 7 :** Stratégie de construction clonale des virus  $\Delta E1$ ,  $\Delta E4$ .

### **Techniques générales de biologie moléculaire**

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories). Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I

d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

5 La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham. L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et  
10 Faloon F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant. La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

15

**Exemple 1. Construction de plasmides portant différentes unités fonctionnelles de la région E4 sous contrôle d'un promoteur**

**1.1. Construction du plasmide pE4Gen**

20 Le plasmide pPY2 correspond au clonage du fragment Avr2-SalI (environ 1.3 kb incluant le promoteur du MMTV) du plasmide pMSG (Pharmacia) entre les sites XbaI et SalI du plasmide pIC20H préparé à partir d'un contexte E. coli dam<sup>+</sup>. Le plasmide pPY4 dérive du plasmide pPY2 par délétion d'un fragment de 35 pb après coupure par BamHI et BglII puis religature. Le plasmide pPY5 correspond au  
25 plasmide pIC20H dans lequel le fragment TaqI-BglII incluant la région E4 de l'adénovirus de type 5 située entre les positions 35576 (TaqI) et 32490 (BglII), a été cloné entre les sites ClaI et BamHI. La région E4 du plasmide pPY5 est donc incluse dans un fragment EcoRV-SphI que l'on peut cloner après digestion partielle entre les sites SmaI et SphI du plasmide pPY4, ce qui génère le plasmide pPY6.  
30 L'insertion du fragment XhoI, qui porte un gène conférant la résistance à la généticine chez les cellules 293, dans le plasmide pPY6 génère le plasmide pE4Gen. Ce plasmide porte donc un gène sélectionnable et la totalité de la région E4 de l'adénovirus exprimée à partir du promoteur du MMTV. Dans ce plasmide particulier ces deux gènes se suivent et les séquences codantes respectives sont portées par le  
35 même brin d'ADN. Dans ce plasmide, le site principal 5' donneur pour l'épissage

localisé en amont de la phase de lecture ORF1 (vers la position 35548) est donc conservé pour assurer un épissage alternatif correct, permettant de générer les différents produits d'expression de toutes les phases codantes de la région E4 et de manière comparable à l'épissage alternatif observé lors du cycle viral.

5

### 1.2. Construction du plasmide pORF6Gen

Le plasmide pPY13 correspond au clonage du fragment Bgl2-XbaI du plasmide pPY6 entre les sites correspondants du plasmide pIC20H. Ce fragment de 1.6 kb inclus donc la séquence de l'adénovirus de type 5 de la position 34115 (Bgl2) à la position 32490 (Bgl2, suivi du site XbaI provenant du multisite de clonage du plasmide pIC20H). Le plasmide pPY13 contient donc la totalité des phases ouvertes de lecture ORF6 et ORF7 de l'adénovirus, maintenant incluses dans un fragment XhoI-SphI. Le clonage de ce fragment entre les sites SalI et SphI du plasmide pPY4 génère le plasmide pPY15. L'insertion du fragment XhoI, qui porte un gène conférant la résistance à la généticine chez les cellules 293, dans le plasmide pPY15 génère le plasmide pORF6Gen. Ce plasmide porte donc un gène sélectionnable et les phases ouvertes de lecture ORF6 et ORF7 de la région E4 de l'adénovirus exprimée à partir du promoteur du MMTV. Dans ce plasmide particulier ces deux gènes se suivent et les séquences codantes respectives sont portées par le même brin d'ADN. Le premier codon d'initiation de la traduction est celui de la phase ouverte ORF6 (position 34077 dans le génome de l'Ad5), et il est séparé du site CAP du promoteur du MMTV par 235 nucléotides. Dans la mesure où l'épissage alternatif est séquentiel et implique en premier lieu la reconnaissance du site 5' donneur, le site principal 5' donneur localisé en amont de la phase de lecture ORF1 (vers la position 35548) n'a donc pas été inclus dans la construction du plasmide pORF6Gen pour permettre ultérieurement une expression efficace des produits des phases de lecture ORF6 et ORF6/7 (figure 4A).

### 1.3. Construction du plasmide pORF4Gen

Le plasmide pPY14 correspond au clonage du fragment Bgl2-XbaI de 1,9 kb (obtenu après digestion partielle par l'enzyme Bgl2), du plasmide pPY6 entre les sites correspondants du plasmide pIC20H. Ce fragment de 1.9 kb inclus donc la séquence de l'adénovirus de type 5 de la position 34387 (Bgl2) à la position 32490 (Bgl2, suivi du site XbaI provenant du multisite de clonage du plasmide pIC20H). Le plasmide pPY14 est donc isogénique au plasmide pPY13 à l'exception qu'il inclus en plus un

fragment Bgl2 correspondant à la totalité de la phase ouverte de lecture ORF4. Ce plasmide contient donc la totalité des phases ouvertes de lecture ORF4, ORF6 et ORF7 de l'adénovirus, maintenant incluses dans un fragment Xho1-Sph1. Le clonage de ce fragment entre les sites Sal1 et Sph1 du plasmide pPY4 génère le plasmide pPY16. L'insertion du fragment Xho1, qui porte un gène conférant la résistance à la  
 5 généticine chez les cellules 293, dans le plasmide pPY16 génère le plasmide pORF4Gen. Ce plasmide porte donc un gène sélectionnable et les phases ouvertes de lecture ORF4, ORF6 et ORF7 de la région E4 de l'adénovirus exprimée à partir du promoteur du MMTV. Dans ce plasmide particulier ces deux gènes se suivent et les  
 10 séquences codantes respectives sont portées par le même brin d'ADN. Comme pour le plasmide pORF6Gen, le site principal 5' donneur localisé en amont de la phase de lecture ORF1 (vers la position 35548) n'a pas été inclus dans la construction du plasmide pORF4Gen pour permettre ultérieurement une expression efficace des produits des phases de lecture ORF4, ORF6 et ORF6/7

15

#### 1.4. Construction des plasmides pJY1 et pJY2

Cet exemple décrit la construction d'un plasmide comportant une unité fonctionnelle de E4 (Cf exemple 1.2.) sous contrôle d'un promoteur dérivé du MMTV. Plus particulièrement, ce promoteur est un dérivé du MMTV comprenant 5  
 20 éléments de réponse aux glucocorticoïdes, c'est à dire un dérivé hautement inductible par les glucocorticoïdes. Ce plasmide a été construit de la manière suivante.

Le fragment BglII de l'Ad5 (position 34115 à 32490) inclus les séquences (ORF6+ORF7) de la région E4. Ce fragment a d'abord été cloné entre les sites BglII et BamHI du plasmide pIC20H (Marsh et al., Gene 32 (1984) 481), ce qui génère le  
 25 plasmide pPY13 dans lequel le site BglII situé en amont de ORF6 est conservé. Le fragment BglII-Sal1 du plasmide pPY13 inclus donc la totalité des séquences (ORF6+ORF7) de la région E4 de l'Ad5. Ce fragment a été cloné entre les sites BamHI et Sal1 du plasmide pIC20H, ce qui génère le plasmide pPY45.

Le fragment XbaI (environ 1 kb) du plasmide pGRE5-1 (Mader et White, PNAS 90 (1993) 5603) correspond à un promoteur dérivé du MMTV, hautement  
 30 inductible par les glucocorticoïdes. Ce fragment a été isolé et cloné entre les sites XbaI du plasmide pIC20H isolé à partir d'un contexte dam-. Le plasmide obtenu a été désigné pPY21. Dans ce plasmide, le site BglII provenant du multisite de clonage du plasmide pIC20H est localisé immédiatement en amont des 5 éléments du promoteur  
 35 capables de lier le récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes. Le fragment BglII-EcoRI



du plasmide pPY21, contenant le promoteur hautement inductible par les glucocorticoïdes, a ensuite été cloné entre les sites BglII et EcoRI du plasmide pIC20H, ce qui génère le plasmide pPY26.

5 Le clonage du fragment EcoRI-SphI du plasmide pPY45 entre les sites correspondants du plasmide pPY26 génère le plasmide pJY1 qui contient les séquences (ORF6+ORF7) de l'Ad5 sous contrôle du promoteur hautement inductible par les glucocorticoïdes (cassette pGRE5/(ORF6+ORF7)).

10 Un dérivé de pJY1 a également été construit contenant un gène de résistance. Le fragment XhoI-Sall du plasmide pMSCV contient un gène conférant la résistance aux cellules eucaryotes à la généticine (APH), exprimé à partir d'un promoteur fort et ubiquitaire (PGK) chez les cellules. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pJY1, au site sall. Le plasmide obtenu a été désigné pJY2. Ce plasmide contient les cassettes d'expression pGRE5/(ORF6+ORF7) et PGK/APH transcrites dans la même direction.

15

### **Exemple 2 - Construction des lignées cellulaires**

Cet exemple décrit la construction de lignées cellulaires complémentantes pour les régions E1 et E4 des adénovirus selon l'invention. Ces lignées permettent la construction et la propagation d'adénovirus recombinants délétés pour ces régions, sans avoir recours à un virus helper.

25 Les lignées de l'invention ont été construites par co-transfection des cellules choisies en présence de phosphate de calcium, par les plasmides décrits dans l'exemple 1 et une construction codant pour le récepteur aux glucocorticoïdes (Hollenberg et al., 1985). Plus précisément, les cellules de la lignée 293 en boîtes de 5cm de diamètre ont été transfectées par 1 à 5 µg de plasmide E4 (pE4Gen, pORF6Gen, pORF4Gen ou pJY2) et éventuellement 5 µg d'un plasmide d'expression du récepteur humain aux glucocorticoïdes exprimé à partir du promoteur précoce du virus SV40 (plasmide pSG5HGR construit par le Dr R. Foy), en présence de phosphate de calcium, selon le  
30 protocole décrit par Graham et Van der Eb (Virology 52 (1973) 456).

#### **2.1. Sélection des clones résistants à la généticine**

Après transfection des cellules, celles ci sont lavées, puis le milieu de culture  
35 (MEM, Sigma) supplémenté en sérum de veau foetal (7% final) est ajouté et les

cellules sont mises à incuber pendant 20 heures. Le lendemain, on sélectionne les cellules en présence de généticine à la concentration effective de 400 mg/l. La généticine est changée tous les trois jours et les clones sélectionnables apparaissent après environ 3 semaines. Quand toutes les cellules non transfectées sont mortes, seules les cellules ayant inséré le gène de résistance subsistent et se divisent pour générer des clones cellulaires. Quand les clones cellulaires sont suffisamment gros pour être visibles à l'oeil nu, ils sont individuellement transférés dans les puits de culture d'une plaque de culture "24 trous". Chaque clone est ensuite progressivement amplifié en présence de généticine d'abord dans les puits d'une plaque de culture "12 trous", puis "6 trous" pour être ensuite amplifié en boîtes de culture cellulaires. Chaque clone cellulaire est alors conservé par congélation dans l'azote liquide.

#### 2.2. Sélection des clones capables de produire des virus défectueux pour E4.

Les adénovirus Ad2dl808 (Weinberg et Ketner, J. Virol. 57 (1986) 833), Ad5dl1004, dl1007 ou dl1014 (Bridge et Ketner, J. Virol. 63 (1989) 631), dl1011 (Bridge et al., Virology 193 (1993) 794) sont des mutants de délétion portant des délétions importantes au niveau de la région E4. Ces mutants sont incapables de se répliquer dans les cellules 293, mais peuvent être produits dans les cellules W162 (Weinberg et Ketner, PNAS 80 (1983) 5383). Dans une seconde étape, les 50 clones résistants à la généticine ont été testés pour leur capacité à produire ces virus E4<sup>-</sup> et donc à transcomplémenter la région E4. 60 clones transfectés par le plasmide pJY2, résistant à la généticine, ont également été criblés pour cette capacité à transcomplémenter la région E4.

Pour cela, chaque clone est infecté en milieu liquide par le virus dl808 à une multiplicité d'infection d'environ 0,1 PFU/cellule (le titre viral est obtenu sur la lignée W162). L'infection a été réalisée à une moi de 0,5 pfu/cellule pour les clones pJY2, dans un milieu supplémenté en dexaméthazone (1  $\mu$ M). L'apparition d'un effet cytopathique amplifiable par réinfection successive des cellules par le lysat cellulaire obtenu est indicateur d'une certaine propagation virale de dl808 par les cellules du clone considéré. Cette transcomplémentation est ensuite objectivée à la fois par analyse du niveau de réplication virale et la faculté des cellules à former des plages virales (un protocole possible est décrit par Hitt, M.; Bett, A.J.; Prevec, L. et Graham, F.L. "Construction and propagation of human adénovirus vectors" in: Cell Biology, a Laboratory Handbook. Volume 1. J.E. Celis (Ed); Academic Press Inc. (San Diego, CA, USA). p479-490) après infection par dl808.

Cette étape a permis de mettre en évidence plusieurs clones particuliers présentant des propriétés efficaces de transcomplémentation de la région E4. Le premier, désigné Clone#2, résulte de la transfection du plasmide pORF6Gen; le second, désigné Clone#4, a été isolé après transfection du plasmide pE4Gen. Des clones stables, capables de transcomplémenter pour la région E4, et hautement inductibles par les glucocorticoïdes ont également été obtenus après transfection des cellules 293 par le plasmide pJY2. Par ailleurs, d'autres clones stables, capables de propager efficacement des virus défectifs pour la région E4, et hautement inductibles par un composé non stéroïde ont encore été préparés. Ces clones ont été obtenus par co-transfection des cellules 293 par le plasmide pJY2 et par un plasmide exprimant un transactivateur artificiel composé d'une région transactivatrice (VP16), de la région qui lie l'ADN provenant du récepteur aux glucocorticoïdes, et d'une partie tronquée en C-terminal du récepteur à la progestérone, de telle sorte que ce récepteur hybride soit capable de transactiver le promoteur GRE5 en présence de RU486 et non de stéroïdes. Les clones obtenus sont effectivement capables de propager efficacement des virus E4-défectifs en présence de RU486.

### 2.3. Capacité à propager des adénovirus déficients pour E1.

La capacité des lignées préparées à compléter la région E1 a été vérifiée après infection par l'adénovirus Ad-RSVβGal. Cet adénovirus de première génération (déficient dans E1 seulement), comprend le gène LacZ de E.coli sous contrôle du promoteur du LTR du virus RSV (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626). Les cellules des clones #2, #4 et des cellules obtenues avec pJY2 ont été infectées par le virus Ad-RSVβGal et une propagation virale a été observée pour chaque clone.

Ces résultats montrent que la capacité des cellules à transcomplémenter la région E1 n'a pas été affectée par l'introduction supplémentaire de la partie distale de la région E4 (clone #2, cellules pJY2) ou de la région E4 complète (clone #4).

### 2.4. Analyse en Southern, Northern blot et RT-PCR pour vérifier l'intégration d'une unité E4 fonctionnelle dans le génome.

Les cellules des clones #2 et #4 ont été analysées en Southern blot pour vérifier l'expression des protéines virales. Plus particulièrement, l'analyse en Southern Blot (analyse du DNA génomique hybridant avec une sonde radioactive provenant de la région E4 adénovirale) a été réalisée selon le protocole décrit par Maniatis et al. A

cet effet, l'ADN génomique des cellules 293 et #2 a été préparé. 2 µg de cet ADN ont été utilisés comme matrice dans une réaction de PCR réalisée en présence de polymérase Taq, de l'oligo 1 de séquence SEQ ID n°1 (correspondant aux nucléotides 52 à 71 du promoteur MMTV) et de l'oligo 2 de séquence SEQ ID n°2 (correspondant aux positions 32921-32940 du génome de l'Ad5). Ces oligo amplifient un fragment de 2617 pb du plasmide pORF6Gen. L'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes : dénaturation à 94°C pendant 5 min, 30 cycles d'amplification par dénaturation à 94°C pendant 1 min, hybridation à 60°C pendant 2 min, et extension à 70°C pendant 3 min, l'extension lors du dernier cycle étant prolongée pendant 10 min. Les produits d'amplification ont ensuite été analysés par électrophorèse SDS 1 % d'agarose et identifiés en Southern Blot et hybridation avec une sonde marquée couvrant la région (ORF6 + ORF7) de l'adénovirus ou la région MMTV.

L'analyse en Northern Blot et RT-PCR (analyse des ARNs cellulaires des clones 2 et 4 hybridant avec une sonde radioactive provenant de la région E4 adénovirale) a été réalisée selon le protocole décrit par Maniatis et al., les ARNs cellulaires polyadénylés ayant été préparés selon le protocole décrit par R.E. Farrell Jr. "RNA isolation strategies", in: RNA Methodologies, a Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Academic Press Inc. (San Diego, CA, USA). p46-92). Pour la RT-PCR, 500 ng des ARN polyA<sup>+</sup> ont été traités avec 0,5 unité de DNase I puis soumis à une transcription inverse avec une amorce oligo(dT). Un dixième de la préparation d'ADNc simple brin ainsi obtenue a été utilisé comme matrice dans une réaction de PCR réalisée au moyen de l'oligo 2 (SEQ ID n°2) et de l'oligo 3 (SED ID n°3), correspondant aux nucléotides 227-246 par rapport au site cap du promoteur MMTV (voir figure 4). Ces oligo ont été construits pour amplifier un fragment de 1255 pb de l'ARNm non épissé ORF6 et un fragment de 545 pb de l'ARNm épissé ORF6/7. Les produits d'amplification ont été analysés en gel SDS 1 % d'agarose et identifiés en Southern Blot et Hybridation à la sonde (ORF6+ORF7) marquée.

Ces analyses ont permis de montrer que ces 2 clones possèdent leur unité fonctionnelle E4 respective intégrée à raison de quelques copies par cellules. De plus, ces études démontrent que ces deux clones expriment la protéine de la fibre de l'adénovirus après infection avec les mutants de délétion Ad5dl1004, Ad5dl1011 et Ad5dl1014 (Figure 5). Cette protéine est une protéine tardive du cycle réplcatif et infectieux de l'adénovirus, dont la synthèse implique l'expression de E4. La présence de

cette protéine dans les cellules infectées par les mutants E4<sup>-</sup> confirme que ces cellules expriment bien une activité E4 fonctionnelle.

Les analyses en Southern Blot indiquent plus particulièrement que le clone #2  
5 contient une copie de la cassette MMTV-(ORF6+ORF7) intégrée dans son génome. L'intégrité de cette cassette a en outre été démontrée par l'amplification au moyen des oligos 1 et 2 qui génère un fragment de 2,6 Kb attendu, qui peut être spécifiquement détecté par une sonde radiomarquée correspondant à l'unité (ORF6+ORF7) ou au promoteur MMTV (figure 4). L'occurrence d'un épissage alternatif correct dans les  
10 cellules de l'invention a également été démontrée par RT-PCR. Ainsi 2 signaux principaux ont été détectés spécifiquement avec la sonde radiomarquée (ORF6+ORF7) dans le clone #2 non infecté, cultivé en présence de dexaméthazone (conditions inductrices). Le signal le plus important est un fragment de 1,3 kb environ, taille qui correspond parfaitement à un produit non épissé dérivé de ORF6/ORF7. L'autre signal  
15 est un fragment de 0,6 kb environ, taille en accord avec l'excision (lors de l'épissage) de l'intron de 712 nucléotides générant le messenger ORF6/7. Ces résultats montrent clairement qu'un épissage alternatif correct se produit dans les cellules de l'invention, et que les deux produits ORF6 et ORF6/7 de la région E4 sont bien exprimés dans ces  
20 cellules.

La capacité des cellules de l'invention à exprimer un produit fonctionnel de la région ORF6 a par ailleurs été démontrée par immunodétection de la protéine de la fibre. Les résultats obtenus montrent que les cellules 293 infectées par l'adénovirus Ad5 dl1007 ne produisent pas de fibres. Au contraire, un signal fibre-spécifique est  
25 détecté dans les cellules de l'invention (clone #2 notamment) après infection par ce mutant, et pas dans les autres cellules non infectées. La présence de la fibre a également été démontrée dans les cellules de l'invention infectées par les mutants dl808, dl1004 (ORF1<sup>+</sup>), dl1011 ou dl 1014 (ORF4<sup>+</sup>) en présence de dexaméthazone.

### 30 2.5. Formation de plages

Cette analyse montre clairement les propriétés particulièrement avantageuses des lignées selon l'invention. En effet, alors que les deux clones (clone#2 et clone#4) sont capables de transcomplémenter la région E4 et de propager avec une efficacité comparable les mutants Ad2dl808 ou Ad5dl1004 par exemple, ils présentent une  
35 différence très significative en ce qui concerne la formation de plages de virus après

infection par les mutants Ad2dl808, Ad5dl1004, Ad5dl1007, Ad5dl1011 ou Ad5dl1014.

La capacité de former des plages de virus est une propriété essentielle des lignées de production. C'est en effet sous cette condition que des clones de virus recombinaux peuvent être isolés, puis amplifiés et purifiés. Les résultats obtenus montrent clairement que la formation de plages de virus est toujours observée avec le clone#2, alors que cela ne se produit que rarement avec le clone#4. Ces résultats démontrent clairement les propriétés très supérieures des lignées de l'invention dans lesquelles seulement une unité fonctionnelle particulière de la région E4 est intégrée.

10

#### 2.6. Expression régulée de l'activité E4

Une autre propriété avantageuse du clone#2 selon l'invention réside le caractère régulé et inductible de l'expression de l'activité E4. Ainsi, les résultats obtenus montrent que la formation de plages de virus n'est observée qu'en présence de dexaméthazone. De même, dans le clone#2, l'expression de la protéine de fibre de l'adénovirus après infection par le mutant Ad5dl1007 est significativement augmentée dans les conditions d'induction (figure 6). Les mêmes résultats ont été obtenus avec les mutants Ad5dl808, Ad5dl1004, Ad5dl1011 et Ad5dl1014. En revanche, l'expression de l'activité E4 dans le clone#4 est constitutive.

20

L'ensemble de ces résultats démontre clairement les avantages des lignées cellulaires de l'invention dans lesquelles seulement une unité fonctionnelle particulière de la région E4 est intégrée. Ces avantages résident en particulier dans la capacité à former des plages de virus et à permettre l'amplification des virus défectifs en milieu liquide. Ces avantages sont également dans le caractère régulé de l'expression de l'activité E4, contrairement aux lignées dans lesquelles des unités fonctionnelles plus grandes de E4 sont présentes.

25

#### **Exemple 3 - Production de virus défectifs pour les fonctions E1 et E4**

30

Cet exemple décrit l'utilisation des lignées cellulaires selon l'invention pour la production de virus recombinaux déficients dans les régions E1 et E4. Ces adénovirus ont été produits par recombinaison homologue, après co-transfection, dans les cellules de l'invention, de deux fragments d'ADN, l'un apportant la partie gauche du génome du virus recombinant (possédant une délétion dans la région E1), l'autre apportant la

35

partie droite du génome du virus recombinant (possédant une délétion dans la région E4).

Plus précisément, les cellules 293E4 (clone#2 et #4) ont été cotransfectées par 10 mg de l'ADN du virus Ad-RSV $\beta$ Gal (Stratford-Perricaudet et al.) digéré par SrfI (ou 5 mg d'ADN du plasmide ayant servi à la construction de ce virus et digéré par XmnI), et 10 mg de l'ADN du virus apportant la délétion fonctionnelle de la région E4 (par exemple Ad2dl808, Ad5dl1004, Ad5dl1007 ou Ad5dl1014) digéré par l'enzyme ClaI. Après apparition de l'effet cytopathique, les virus sont purifiés par au moins deux cycles consécutifs d'étalement en solide pour la formation de plaques sur clone 2. Les plaques correspondant à l'infection du virus recherché (analyse de l'ADN démontrant la double délétion E1 et E4) sont alors amplifiées par des cycles d'infection consécutives. Des stocks à titre élevés sont préparés par purification sur gradient de chlorure de césium. Les virus sont conservés à -80°C selon les techniques classiques de l'homme de l'art.

Outre la faculté du clone 2 à faire des plaques virales, il permet une propagation en milieu liquide particulièrement efficace pour le virus AD5dl1014 (E1<sup>+</sup>E4<sup>-</sup> mais ORF4<sup>+</sup>) ou pour le virus E1<sup>-</sup>E4<sup>-</sup> construit à partir du virus dl1014.

Par contre le clone 4 obtenu après transfection du plasmide pE4Gen n'est pas très performant pour faire des plaques car il a du mal à tenir la confluence cellulaire pendant un temps suffisamment long pour que les plaques de lyse virale soient facilement repérables (et surtout si le virus recombinant recherché ne code pas pour la  $\beta$ galactosidase).

Une méthode alternative de production repose sur la construction clonale des virus selon l'invention. Plus particulièrement, selon cette méthode, les adénovirus  $\Delta$ E1 $\Delta$ E4 sont produits par double-recombinaison homologue in vivo après co-transfection de 3 fragments d'ADN recouvrants, apportant chacun une partie du génome du virus.

Plus particulièrement, les 3 fragments recouvrants suivants, dérivés des génomes AdRSV $\beta$ gal et Ad dl1014, ont été purifiés par électroélution (Figure 7) :

i) Fragment I . Ce fragment est un fragment NarI de 6,8 kb codant pour la  $\beta$ gal correspondant à la partie gauche ( $\Delta$ E1) du génome de AdRSV $\beta$ gal. Sa contamination par un génome AdRSV $\beta$ gal non coupé (et donc réplcatif) est fortement improbable

car la digestion complète par NarI génère ce fragment parmi 25 autres allant de 26 nucléotides à 3,8 kb.

5 ii) Fragment II : Ce fragment est un fragment DraI de 9,4 kb également dérivé du génome de AdRSV $\beta$ gal, et qui se chevauche avec le fragment I sur 1509 nucléotides (cf Figure 7). La contamination de ce fragment par un génome infectieux est également impossible dans la mesure où ce fragment a été purifié à partir de 10 fragments supplémentaires de taille comprise entre 494 nucléotides et 4,8 kb, après digestion totale par DraI et Afl II.

10 iii) Fragment III : Ce fragment est un fragment NsiI de 21,3 kb dérivé du génome de Ad5 dl1014. Il chevauche le fragment II sur 1652 nucléotides (Figure 7). Ce fragment apporte la partie droite du génome du virus recombinant, contenant la région E4 modifiée ( $\Delta$ E4, ORF4<sup>+</sup>). Sa contamination est encore une fois plus qu'improbable puisqu'il a été purifié après digestion complète par NsiI générant 7 fragments de taille comprise entre 178 nucléotides et 4 kb.

15 Les fragments purifiés ont été co-transfectés dans les cellules clone #2 selon le protocole décrit pour les cellules 293, en présence de 1  $\mu$ M de dexaméthazone dans le milieu (ajouté tous les 4 jours pendant 3 semaines). Au terme de cette culture, les cellules ont été récoltées, congelées et décongelées 3 fois dans un bain glace/éthanol, puis centrifugées à 3000 g pendant 20 min. Le lysat cellulaire a ensuite été ajouté à une culture fraîche de cellules clone #2 (également désignées IGRP2) en présence de dexaméthazone (1 $\mu$ M). Après 5 jours, un effet cytopathique a été observé, démontrant la production des virus. Un stock de ce virus recombinant Ad $\Delta$ E1,  $\Delta$ E4, ORF4<sup>+</sup> a été obtenu après amplification progressive du mélange induisant l'effet cytopathique sur 100 boîtes de 10 cm contenant des cellules clone #2 à sous-confluence, en présence de 1 $\mu$ M dexaméthazone. Après purification sur gradient de chlorure de césium et dialyse à 4°C, le stock viral a été titré sur monocouches de cellules clone #2 supplémentées de dexaméthazone (1 $\mu$ M), avant coloration in vitro avec du X-Gal. Dans la mesure où toutes les plaques sont positives, le titre peut-être exprimé soit en pfu / ml soit en plaque virale exprimant la  $\beta$ -gal. Selon cette procédure, un stock de 10<sup>10</sup> pfu a été préparé. L'absence de RCA dans ce stock a ensuite été contrôlée par analyses de restriction et en southern. Pour cela l'ADN viral d'un recombinant du stock a été préparé selon la technique de Challberg (Virology 114 (1981) 196). 2 $\mu$ g de cet ADN ont été soumis à une analyse de restriction et gel d'agarose 1 %. Les fragments ont été transférés sur membrane Hybond-N

20

25

30

35



(Amersham) et hybridés avec une sonde radioactive correspondant aux ITRs de l'adénovirus pour détecter spécifiquement les fragments localisés aux extrémités du génome viral.

5 L'analyse de restriction par les enzymes SmaI, AflII ou StuI a donné les profils attendus, pour des préparations non contaminées par des fragments E1<sup>+</sup> ou E4<sup>+</sup> comme en témoigne la stoechiométrie relative des différents fragments de restriction.

10 L'analyse en Southern après transfert sur membranes montre que la digestion par StuI génère seulement 2 fragments hybridant avec la sonde ITR : Un de ces fragments présente une mobilité correspondant à celle du fragment de 1125 pb de AdRSVβgal codant pour la βgal, l'autre migre comme le fragment StuI de 2673 pb de Ad5dl1014 portant la délétion E4. Une exposition prolongée de l'autoradiogramme ne fait apparaître aucune bande supplémentaire ayant une taille correspondant au fragment E1<sup>+</sup> (3158-bp) ou E4<sup>+</sup> (3980 pb). De même, un fragment correspondant en  
15 taille (3267 pb) à l'introduction de l'unité E4 fonctionnelle (ORF4 + ORF6 + ORF7) dans le génome du recombinant n'a pas été détecté, démontrant qu'il n'y a pas eu d'évènement de double recombinaison pendant la production entre le génome viral et l'unité E4 intégrée dans la cellule. Ces résultats démontrent donc que les cellules de l'invention peuvent être utilisées pour produire efficacement des lots de virus ΔE1, ΔE4 dépourvus de RCA.

20

#### **Exemple 4 - Production d'AAV recombinants**

25 Cet exemple décrit l'utilisation des lignées cellulaires contenant tout ou une partie de la région E4 d'un génome adénoviral pour la production d'AAV. Ces AAV ont été produits par co-transfection, dans lesdites cellules, d'un plasmide ITR-AAV et d'un plasmide Rep/Cap, et par co-infection avec un adénovirus helper.

#### **Plasmides et virus utilisés**

30 - Plasmide ITR-AAV, désigne pMA10 : Ce plasmide comporte un acide nucléique d'intérêt (cassette d'expression du gène β-gal d'E.coli composée du promoteur du LTR-RVS, du gène LacZ précédé d'un signal de localisation nucléaire, et du site de polyadénylation du virus SV40) bordé de 2 ITR d'AAV. Le plasmide pMA10 a été obtenu en digérant le plasmide pXL2582 par SpeI et en refermant par traitement à l'ADN ligase du bacteriophage T4. Ce traitement permet de supprimer les  
35 séquences palindromiques en aval de l'ITR gauche de l'AAV. Le plasmide pXL2582 a

ete obtenu en ligaturant les fragments suivants dans les sites EcoRI-KpnI de pXL2359 (decrit dans la demande FR94 02445) :

a) EcoRI-XbaI (contenant l'ITR gauche de l'AAV jusqu'au nucleotide 155, site HinfI sur la sequence publiee de l'AAV) de pXL2580, et,

5 b) XbaI-KpnI de pXL2359 (contenant la cassette d'expression du gene LacZ)  
Le plasmide pXL2580 a ete obtenu a partir de pXL2359 de la maniere suivante :  
pXL2359 a ete digere par EcoRI-XbaI et depose sur gel d'agarose 1%, d'ou un  
fragment de 650 pb a ete purifie. Ce fragment a ete redigere par HinfI et traite a  
l'ADN polymerase du bacteriophage T4, recoupe par PstI puis depose sur gel  
10 d'agarose 2%, d'ou un fragment de 200 pb a ete purifie. Ce fragment, contenant l'ITR  
gauche de l'AAV jusqu'au nucleotide 155 a ete introduit entre les sites PstI-SmaI de  
pBSKS+ (Stratagene).

- Plasmide Rep/Cap : Le plasmide utilise, designe p $\Delta$ Bal, a ete decrit par  
15 Lebkowski et al (Mol. Cel. Biol. 8 (1988) 3988). Ce plasmide contient les regions rep  
et cap de l'AAV sous controle du promoteur endogene P5. D'autres promoteurs  
peuvent etre substitues au promoteur P5, tels que notamment le promoteur constitutif  
du LTR-RVS.

- L' adenovirus helper utilise est un adenovirus sauvage Ad5. Il est entendu  
20 que d'autres virus helper peuvent etre utilises, et notamment un Ad5 defectif pour la  
region E1 et/ou E4, ou un adenovirus canin. L'interet d'utiliser un adenovirus canin  
reside dans leur capacite a supporter la replication des AAV tout en etant des virus  
defectifs chez l'homme. De ce fait, les preparations d'AAVr obtenues sont totalement  
depourvues de RCA et d'adenovirus humain contaminant.

25

### Protocole

La production a ete realisee par transfection de 20 boites de 5cm de diametre  
de cellules Clone#2 (IGRP2), a la densite de  $3 \cdot 10^6$  cellules par boite environ,  
prealablement inoculees 24 a 48 heures dans du milieu MEM 10%SVF. Dans chaque  
30 boite ont ete co-transfectes 1  $\mu$ g de plasmide pMA10 et 5  $\mu$ g de plasmide p $\Delta$ Bal en  
presence de 16  $\mu$ g de peptide H1, de 16,5  $\mu$ l de lipofectamine (Gibco-BRL, Life  
Technologies) et de OPTIMEM lipofectamine (Gibco-BRL, Life Technologies) selon  
les recommandations du fournisseur. Apres 4 a 16 heures de contact du melange sur  
les cellules, le melange de transfection a ete retire et les cellules ont ete infectees  
35 pendant une heure avec l'adenovirus helper, avec un infectivite de 10 pfu de virus par

cellule dans un volume final de 500  $\mu$ l. Du milieu MEM10%SVF + dexamethasone  $10^6$  M a ensuite ete ajoute. Les cellules ont ete recoltees 5 jours apres, reprises dans un tampon Tris Hcl 10 mM, pH 8, lysees par 3 congelations decongelations, puis traitees avec du deoxycholate de sodium et a la trypsine aux concentrations respectives de  
5 0.25% et de 1% pendant 30 min a 37C. Les AAV recombinants produits ont ensuite ete purifies sur gradient de chlorure de cesium a la densite de 1.4, dans un rotor SW55.1 a 35000rpm pendant 20 heures.

Ces experiences ont permis d'obtenir des titres eleves de virus recombinants :  
10<sup>11</sup> genomes par ml. Ce procede permet donc de produire des quantites tres elevees  
10 d'AAV recombinants (les procedes decrits dans l'art anterieur conduisent a des titres 10 a 100 fois inferieurs), ayant des qualites propres a un usage therapeutique chez l'homme. En outre, il est tres facile d'utiliser des quantites de cellules 10 fois plus importantes, et donc d'obtenir un titre en virus plus eleve.

LISTE DE SEQUENCE

5

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

10	AAGCAGCCAA GGGGTTGTTT	20
----	-----------------------	----

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

15	ACCCTAGTAT TCAACCTGCC	20
----	-----------------------	----

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

20	ATCATCACAA GAGCGGAACG	20
----	-----------------------	----

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

25	CATCCTCTTA CACTTTTTCA TACATTGCCC AAGAATAAAG AATCGTTTGT GTTATGTTTC	60
	AACGTGTTTA TTTTCAATT GCAGAAAATT TCAAGTCATT TTTCATTCAG TAGTATAGCC	120
	CCACCACCAC ATAGCTTATA CAGATCACCG TACCTTAATC AAACCTACAG AACCCCTAGTA	180
30	TTCAACCTGC CACCTCCCTC CCAACACACA GAGTACACAG TCCTTTCTCC CCGGCTGGCC	240
	TTAAAAAGCA TCATATCATG GGTAACAGAC ATATTCTTAG GTGTTATATT CCACACGGTT	300
35	TCCTGTCGAG CCAAACGCTC ATCAGTGATA TTAATAAACT CCCCAGGCGAG CTCACTTAAG	360
	TTTCATGTCG TGTCCAGCTG CTGAGCCACA GGCTGCTGTC CAACTTGCGG TTGCTTAACG	420
	GGCGGCGAAG GAGAAGTCCA CGCCTACATG GGGGTAGAGT CATAATCGTG CATCAGGATA	480
40	GGGCGGTGGT GCTGCAGCAG CGCGCGAATA AACTGCTGCC GCCGCCGCTC CGTCCTGCAG	540
	GAATACAACA TGGCAGTGGT CTCCTCAGCG ATGATTGCGA CCGCCCGCAG CATAAGGCGC	600
45	CTTGTCCTCC GGGCACAGCA GCGCACCTG ATCTCACTTA AATCAGCACA GTAACGTCAG	660
	CACAGCACCA CAATATTGTT CAAAATCCCA CAGTGCAAGG CGCTGTATCC AAAGCTCATG	720
	GCGGGGACCA CAGAACCCAC GTGGCCATCA TACCACAAGC GCAGGTAGAT TAAGTGGCGA	780
50	CCCCTCATAA ACACGCTGGA CATAAACATT ACCTCTTTTG GCATGTTGTA ATTCACCACC	840
	TCCCGGTACC ATATAAACCT CTGATTAAAC ATGGCGCCAT CCACCACCAT CCTAAACCAG	900
55	CTGGCCAAAA CCTGCCCGCC GGCTATACAC TGCAGGGAAC CGGGACTGGA ACAATGACAG	960
	TGGAGAGCCC AGGACTCGTA ACCATGGATC ATCATGCTCG TCATGATATC AATGTTGGCA	1020
	CAACACAGGC ACACGTGCAT AACTTCCTC AGGATTACAA GCTCCTCCCG CGTTAGAACC	1080

	ATATCCCAGG GAACAACCCA TTCCTGAATC AGCGTAAATC CCACACTGCA GGGAAAGACCT	1140
5	CGCACGTAAC TCACGTTGTG CATTGTCAAA GTGTTACATT CGGGCAGCAG CGGATGATCC	1200
	TCCAGTATGG TAGCGCGGGT TTCTGTCTCA AAAGGAGGTA GACGATCCCT ACTGTACGGA	1260
	GTGCGCCGAG ACAACCGAGA TCGTGTGGT CGTAGTGTCA TGCCAAATGG AACGCCGGAC	1320
10	GTAGTCATAT TTCCTGAAGC AAAACCAGGT GCGGGCGTGA CAAACAGATC TGCGTCTCCG	1380
	GTCTCGCCGC TTAGATCGCT CTGTGTAGTA GTTGTAGTAT ATCCACTCTC TCAAAGCATC	1440
15	CAGGCGCCCC CTGGCTTCGG GTTCTATGTA AACTCCTTCA TGCGCCGCTG CCCTGATAAC	1500
	ATCCACCACC GCAGAATAAG CCACACCCAG CCAACCTACA CATTGTTTCT GCGAGTCACA	1560
	CACGGGAGGA GCGGGAAGAG CTGGAAGAAC CATGTTTTTT TTTTATTCC AAAAGATTAT	1620
20	CCAAAACCTC AAAATGAAGA TCTATTAAGT GAACGCGCTC CCCTCCGGTG GCGTGGTCAA	1680
	ACTCTACAGC CAAAGAACAG ATAATGGCAT TTGTAAGATG TTGCACAATG GCTTCCAAAA	1740
25	GGCAAACGGC CCTCACGTCC AAGTGGACGT AAAGGCTAAA CCCTTCAGGG TGAATCTCCT	1800
	CTATAAACAT TCCAGCACCT TCAACCATGC CCAAATAATT CTCATCTCGC CACCTTCTCA	1860
	ATATATCTCT AAGCAAATCC CGAATATTAA GTCCGGCCAT TGTA AAAATC TGCTCCAGAG	1920
30	CGCCCTCCAC CTTCAGCCTC AAGCAGCGAA TCATGATTGC AAAAATTCAG GTTCCTCACA	1980
	GACCTGTATA AGATTCAAAA GCGGAACATT AACAAAAATA CCGCGATCCC GTAGGTCCCT	2040
35	TCGCAGGGCC AGCTGAACAT AATCGTGCAG GTCTGCACGG ACCAGCGCGG CCACTTCCCC	2100
	GCCAGGAACC ATGACAAAAG AACCACACT GATTATGACA CGCATACTCG GAGCTATGCT	2160
	AACCAGCGTA GCCCCGATGT AAGCTTGTTG CATGGGCGGC GATATAAAAT GCAAGGTGCT	2220
40	GCTCAAAAA TCAGGCAAAG CCTCGCGCAA AAAAGAAAGC ACATCGTAGT CATGCTCATG	2280
	CAGATAAAGG CAGGTAAGCT CCGGAACCAC CACAGAAAAA GACACCATT TTTCTCTCAA	2340
45	CATGTCTGCG GGTTTCTGCA TAAACACAAA ATAAAATAAC AAAAAACAT TTAAACATTA	2400
	GAAGCCTGTC TTACAACAGG AAAACAACC CTTATAAGCA TAAGACGGAC TACGGCCATG	2460
	CCGGCGTGAC CGTAAAAAAA CTGGTCACCG TGATTAAAAA GCACCACCGA CAGCTCCTCG	2520
50	GTCATGTCCG GAGTCATAAT GTAAGACTCG GTAAACACAT CAGGTTGATT CACATCGGTC	2580
	AGTGCTAAAA AGCGACCGAA ATAGCCCGG GGAATACATA CCCGCAAGCG TAGAGACAAC	2640
55	ATTACAGCCC CCATAGGAGG TATAACAAAA TTAATAGGAG AGAAAAACAC ATAAACACCT	2700
	GAAAAACCTT CCTGCCTAGG CAAAATAGCA CCCTCCCGCT CCAGAACAAC ATACAGCGCT	2760
	TCCACAGCGG CAGCCATAAC AGTCAGCCTT ACCAGTAAAA AAGAAAACCT ATTAAAAAAA	2820

	CACCACTCGA CACGGCACCA GCTCAATCAG TCACAGTGTA AAAAAGGGCC AAGTGCAGAG	2880
	CGAGTATATA TAGGACTAAA AAATGACGTA ACGGTAAAG TCCACAAAAA ACACCCAGAA	2940
5	AACCGCACGC GAACCTACGC CCAGAAACGA AAGCCAAAAA ACCCACAAC TCTCAAATC	3000
	GTCACTTCG TTTTCCCACG TTACGTCACT TCCCATTTTA AGAAAACTAC AATTCCCAAC	3060
	ACATACAAGT TACTCCGCCC TAAAACCTAC GTCACCCGCC CCGTTCCCAC GCCCCGCGCC	3120
10	ACGTCACAAA CTCCACCCCC TCATTATCAT ATTGGCTTCA ATCCAAAATA AGGTATATTA	3180
	TTGATGATG	3189

15

## REVENDICATIONS

1. Cellule utilisable pour la production d'adénovirus défectifs caractérisée en ce qu'elle comprend, insérée dans son génome, une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus portant la phase de lecture ORF6 sous contrôle d'un promoteur fonctionnel.  
5
2. Cellule selon la revendication 1 caractérisée en ce que la partie de la région E4 comprend les phases de lecture ORF6 et ORF6/7.
3. Cellule selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que la partie de la région E4 est issue d'un génome d'adénovirus humain du groupe C.
- 10 4. Cellule selon la revendication 3 caractérisée en ce que la région E4 est issue du génome d'un adénovirus Ad2 ou Ad5
5. Cellule selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le promoteur est un promoteur inductible.
- 15 6. Cellule selon la revendication 5 caractérisée en ce que le promoteur est choisi parmi le promoteur MMTV et ses dérivés.
7. Cellule selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle dérive d'une cellule qui transcomplémente pour la région E1.
8. Cellule selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'elle dérive de la lignée cellulaire 293.
- 20 9. Cellule selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'elle dérive des cellules KB, Hela, MDCK, Véro ou gmDBP6
10. Cellule selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'elle dérive d'une culture de cellules primaires.
- 25 11. Cellule utilisable pour la production d'adénovirus défectifs caractérisée en ce qu'elle comprend, insérée dans son génome, un fragment BglII-BglII correspondant aux nucléotides 34115-32490 du génome de l'Ad5.

12. Cellule selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la lignée 293.

13. Cellule selon la revendication 11 ou 12 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la lignée 293 transformée par le plasmide pORF6Gen.

5 14. Cellule utilisable pour la production d'adénovirus défectifs caractérisée en ce qu'elle comprend, insérée dans son génome, un fragment BglII-PvuII correspondant aux nucléotides 34115-33126 du génome de l'Ad5.

15. Plasmide comprenant une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus portant la phase de lecture ORF6 sous contrôle d'un promoteur  
10 inductible.

16. Plasmide selon la revendication 15 caractérisé en ce que la partie de la région E4 du génome d'adénovirus porte les phases de lecture ORF6 et ORF6/7.

17. Plasmide selon la revendication 16 caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pORF6Gen.

15 18. Utilisation d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 14 pour la production d'adénovirus recombinants défectifs au moins pour la région E4.

19. Procédé de production d'adénovirus recombinants défectifs au moins pour la région E4 caractérisé en ce que l'on transforme une culture de cellules selon l'une des revendications 1 à 14 avec un ou plusieurs plasmides apportant les différentes  
20 régions du génome dudit adénovirus recombinant défectif puis on récolte les virus produits.

20. Procédé selon la revendication 19 pour la production d'adénovirus recombinants défectifs pour les régions E1 et E4.

21. Procédé selon la revendication 19 ou 20 caractérisé en ce que la culture  
25 de cellules est une culture de cellules selon l'une des revendications 11 à 14.

22. Stock d'adénovirus recombinant défectifs purifié obtenu selon le procédé des revendications 19 à 21.



23. Adénovirus recombinant défectif  $\Delta E1, ORF3^-, ORF6^-$  comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et des nucléotides 34801-34329 et 34115-33126 de la région E4.

5           24. Adénovirus recombinant défectif  $\Delta E1, \Delta E4, ORF1^+$  comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et une délétion de la région E4 à l'exception de la phase de lecture ORF1.

10           25. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 24 caractérisé en ce qu'il comprend une délétion dans la région E1 et une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF7 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF2

15           26. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 25 caractérisé en ce qu'il comprend une délétion dans la région E4 couvrant les nucléotides 33093 à 35053.

20           27. Adénovirus recombinant défectif  $\Delta E1, \Delta E4, ORF4^+$  comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et une délétion de la région E4 à l'exception de la phase de lecture ORF4.

25           28. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 27 caractérisé en ce qu'il comprend une délétion dans la région E1, une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF7 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF6, et une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF3 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF1 ou dans la région promotrice de E4.

30           29. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 28 caractérisé en ce qu'il comprend une délétion dans la région E1, une délétion couvrant les nucléotides 33093(SmaI)-33695 et une délétion couvrant les nucléotides 34634-35355(SmaI).

35           30. Adénovirus recombinant défectif  $\Delta E1, \Delta E4$  comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et une délétion couvrant la totalité de la région E4, choisie parmi les délétions suivantes : nucléotides 32720-35835, ou 33466-35355 ou

33093-35355.

31. Utilisation d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 14 pour la production d'AAV recombinants.

5

32. Utilisation selon la revendication 31 d'une cellule comprenant, insérée dans son genome, tout ou une partie de la region E4 du genome d'un adénovirus comportant au moins la phase de lecture ORF6.

10

33. Procédé de production d'AAV recombinants caractérisé en ce que l'on introduit dans une culture de cellules comprenant, insérées dans leur genome, une partie de la region E4 du genome d'un adénovirus comportant au moins la phase de lecture ORF6 :

15

- un plasmide AAV portant un acide nucleique d'interet borde d'ITRs d'AAV,

- un adénovirus helper, et,

- les fonctions Rep et Cap de l'AAV.

puis on récolte les virus produits.

20

34. Procédé selon la revendication 33 caractérisé en ce que la culture de cellules est une culture de cellules comportant l'intégralité de la region E4.

25

35. Procédé selon la revendication 33 caractérisé en ce que la culture de cellules est une culture de cellules comportant la phase de lecture ORF6 et éventuellement la phase de lecture ORF6/7.

36. Procédé selon la revendication 35 caractérisé en ce que la culture de cellules est une culture de cellules telles que définies dans les revendications 1 à 14.

37. Procédé selon la revendication 33 caractérisé en ce que l'adénovirus helper est un adénovirus humain déficient pour la region E4.

30

38. Procédé selon la revendication 37 caractérisé en ce que l'adénovirus helper est un adénovirus humain déficient pour les régions E1 et E4.

39. Procédé selon la revendication 33 caractérisé en ce que l'adénovirus helper defectif est un adénovirus canin, de préférence choisi parmi les souches CAV2.

5 40. Procédé selon la revendication 33 caractérisé en ce que les fonctions rep et cap sont apportées par co-transfection des cellules avec un plasmide portant les régions rep et cap de l'AAV.

10 41. Procédé selon la revendication 33 caractérisé en ce que les plasmides sont transfectés en présence d'un agent compactant les acides nucléiques et d'un lipide cationique.

15 42. Procédé de production d'AAV recombinants caractérisé en ce que, dans une culture de cellules transcomplémentant des fonctions E1 et E4 de l'adénovirus, on cotransfecte en présence d'un lipide polycationique et d'un agent compactant un plasmide AAV portant un acide nucléique d'intérêt bordé d'ITRs d'AAV et un plasmide portant les régions rep et cap de l'AAV; on co-infecte ladite culture avec un adénovirus helper choisi parmi les adénovirus humains d'origine Ad2 ou Ad5 defectifs pour les régions E1 et E4 et les adénovirus canins d'origine CAV2, puis on récolte les virus produits.

20

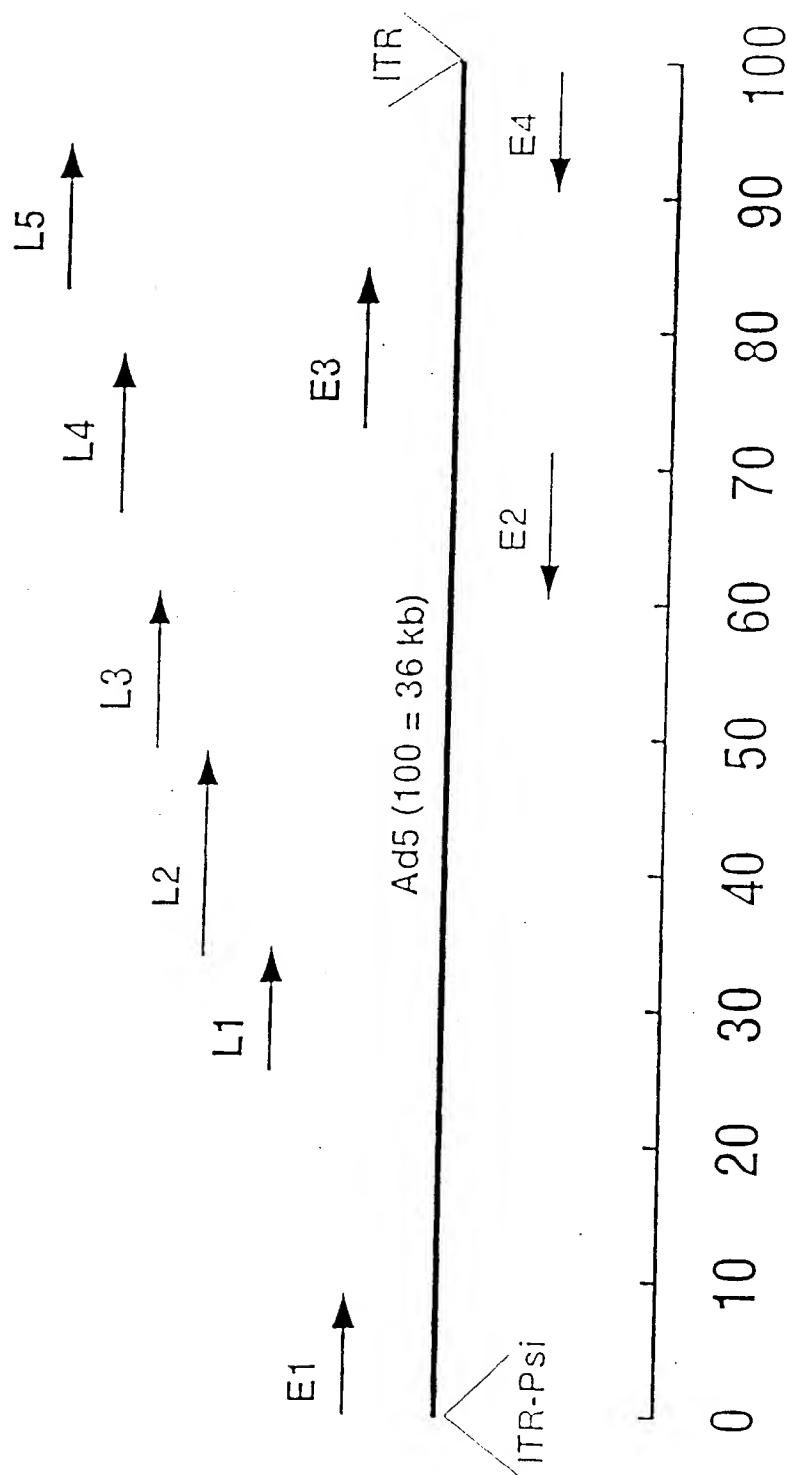


Figure 1

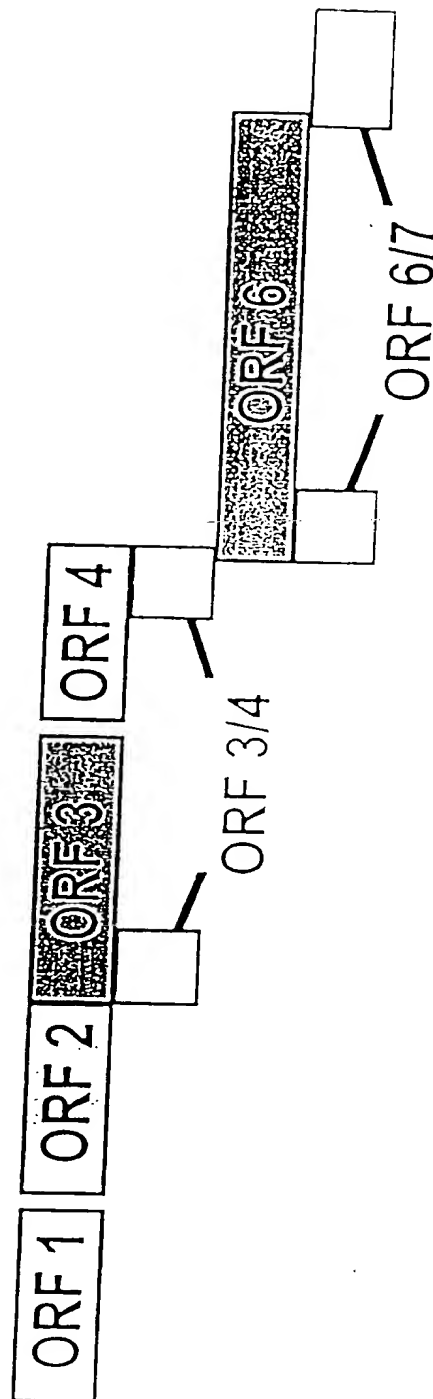


Figure 2

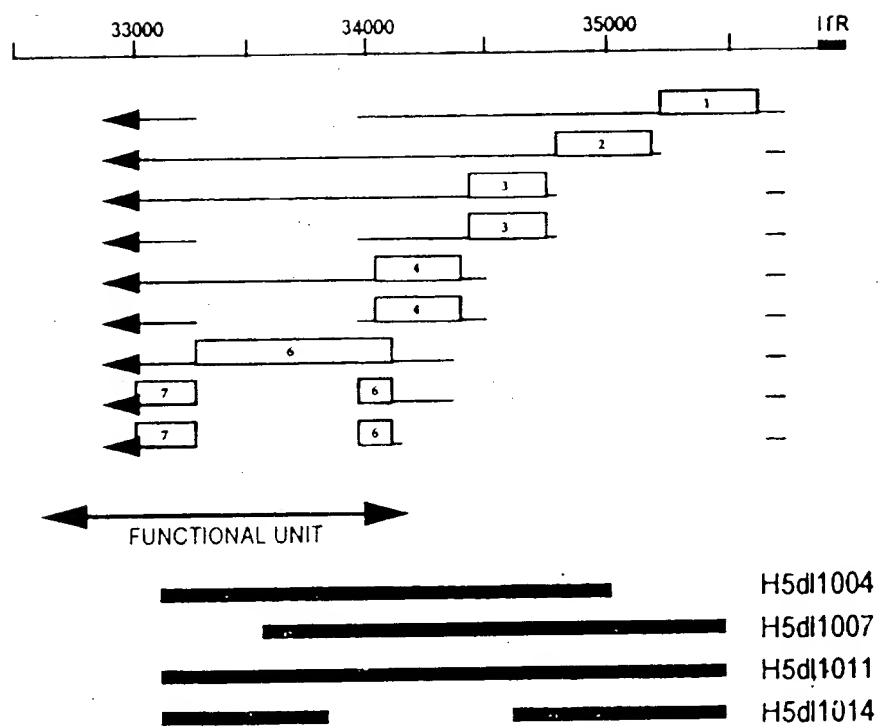


Figure 3

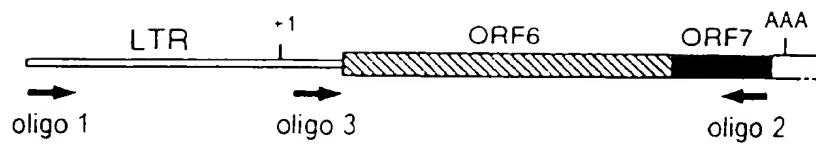


Figure 4A

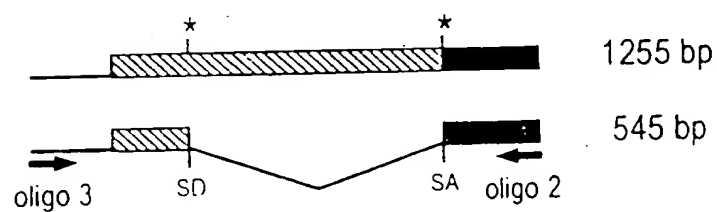


Figure 4B

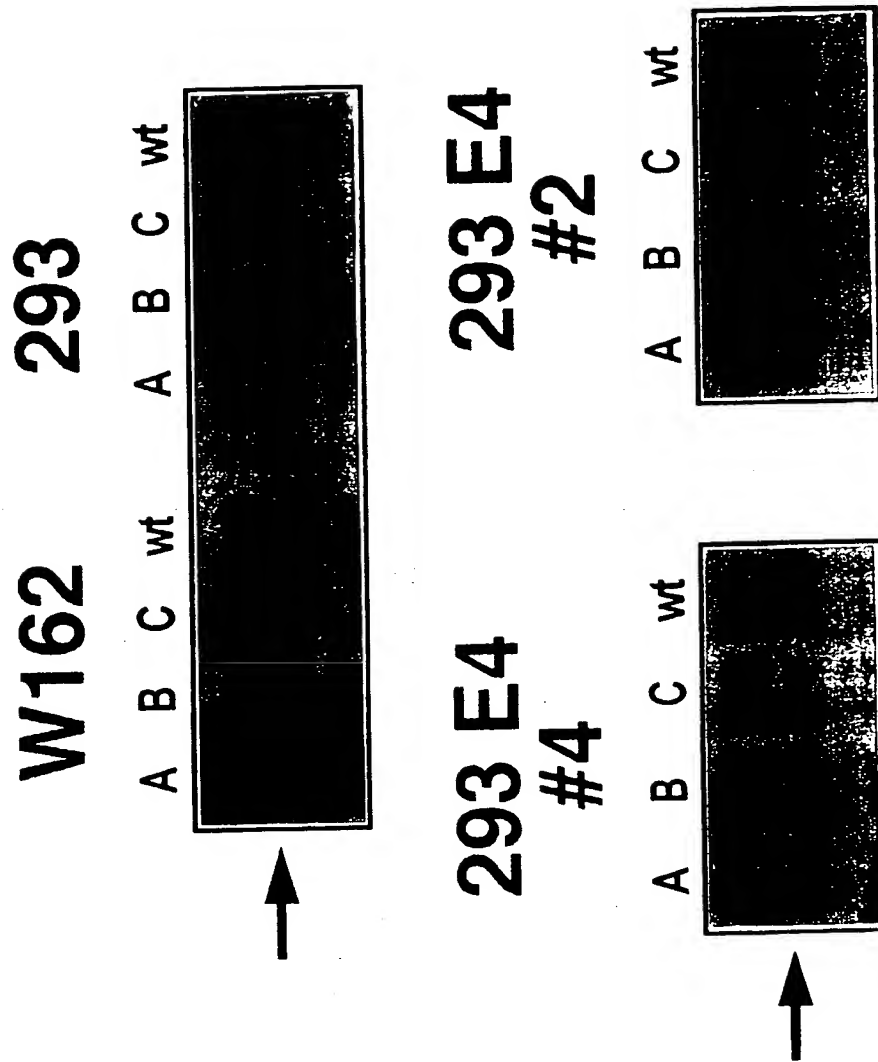


Figure 5



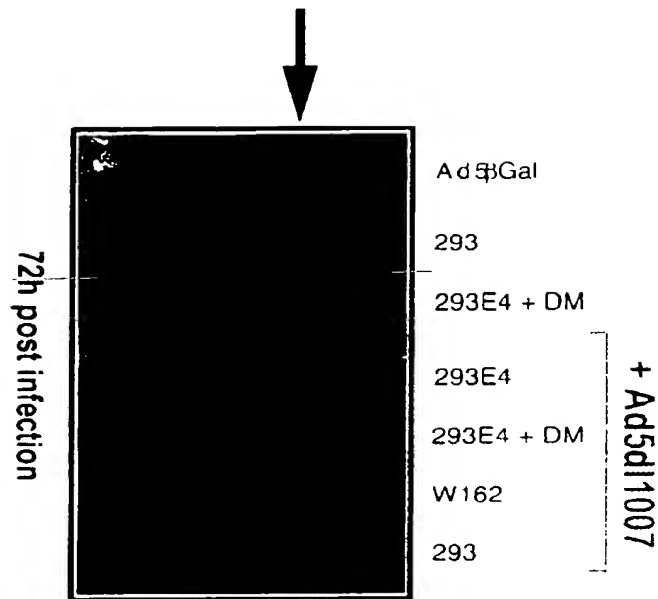


Figure 6

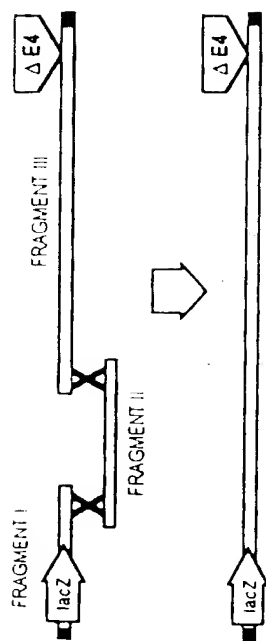


Figure 7

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFA 517954  
FR 9510541

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	WO-A-95 02697 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 26 Janvier 1995	1-10, 18-22
Y	* page 21, ligne 20 - ligne 26; revendications 1-28 *	11-14,30
X	--- NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 8, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 3037-3048, XP002003252 G. KETNER ET AL.: "Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids"	15-19
Y	* page 3046, ligne 11 - ligne 17 *	1-14, 20-22,30
X	--- WO-A-94 28152 (TRANSGENE) 8 Décembre 1994	30
Y	* page 13, ligne 29 - ligne 33; revendication 40; figures 1-11 * * page 13, ligne 19 - ligne 21 *	1-22
X	--- VIROLOGY, vol. 194, 1993, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US, pages 50-58, XP002003253 K. ÖHMAN ET AL.: "Two adenovirus proteins with redundant activities in virus growth facilities tripartite leader mRNA accumulations" * page 50, ligne 7 - ligne 10 * * page 50, colonne de droite, ligne 6 - page 51, colonne de gauche, ligne 40 *	15-17
	--- -/-	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
17 Mai 1996		Hornig, H
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 (01.82) (P04C11)

INSTITUT NATIONAL

## RAPPORT DE RECHERCHE

## PRELIMINAIRE

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFA 517954  
FR 9510541

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 6, no. 3, Mars 1995, NATIONAL HELENIC RES. FOUNDATION, ATHENS, GREECE, pages 663-668, XP002003254 K. ÖHMAN ET AL.: "Effect of adenovirus-2 early region 4 products on E1 transformation" * le document en entier *	15-17
Y	FR-A-2 707 664 (CNRS) 20 Janvier 1995 * page 7, ligne 26 - page 10, ligne 12 *	1-22,30
Y	WO-A-94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 Juin 1994 * page 18, ligne 6 - ligne 19 * * page 58, ligne 30 - ligne 34 *	1-22,30
D,Y	VIROLOGY, vol. 193, no. 2, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US, pages 794-801, XP002003255 E. BRIDGE ET AL.: "Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis" * page 799, colonne de droite, ligne 40 - page 800, colonne de gauche, ligne 4 *	1-22,30
A	J. VIROLOGY, vol. 65, no. 3, AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 1440-1449, XP002003256 C. HEMSTRÖM ET AL.: "Adenovirus E4-dependent activation of the early E2 promoter is insufficient to promote early-to-late-phase transition" en entier	1-42
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
17 Mai 1996		Hornig, H.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande I : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREde la  
PROPRIETE INDUSTRIELLEétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFA 517954  
FR 9510541

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	J. VIROLOGY, vol. 57, no. 3, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 833-838, XP002003257 D.H. WINBERGER AND G. KETNER: "Adenoviral region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression" en entier ---	1-42
D,A	J. VIROLOGY, vol. 63, no. 2, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 631-638, XP002003258 E. BRIDGE AND G. KETNER: "Redundant control of adenovirus late gene expression" * page 637, colonne de gauche, ligne 13 - colonne de droite, ligne 12 * ---	1-42
D,A	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 80, NATL. ACADEMY SCI.,WASHINGTON,DC,US;, pages 5383-5386, XP002003259 D.H. WEINBERG AND G. KETNER: "A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of adenovirus type 2" en entier ---	1-42
A	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, Janvier 1995, THE BRITISH COUNCIL, UK, pages 31-44, XP002003260 E.J. KREMER AND M. PERRICAUDET: "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer" * le document en entier * ---	31-42
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
17 Mai 1996		Hornig, H
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 (03.92) (P&amp;C13)

INSTITUT NATIONAL

## RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFA 517954  
FR 9510541

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 3, no. 1, - Février 1995 HUMANA PRESS INC., US, pages 9-15, XP002003261 F. ROLLING AND R.J. SAMULSKI: "AAV as a viral vector for human gene therapy" * le document en entier *	31-42
A	WO-A-95 20671 (RHONE POULENC RORER SA ;DESCAMPS VINCENT (FR); PERRICAUDET MICHEL) 3 Août 1995 * le document en entier *	31-42
A	WO-A-95 06743 (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9 Mars 1995 * le document en entier *	31-42
T	JOURNAL OF VIROLOGY 70 (1). 1996. 559-565. ISSN: 0022-538X, Janvier 1996, XP002003262 YEH P ET AL: "Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit." * le document en entier *	1-42
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
17 Mai 1996		Hornig, H
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)